

## PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/147753>

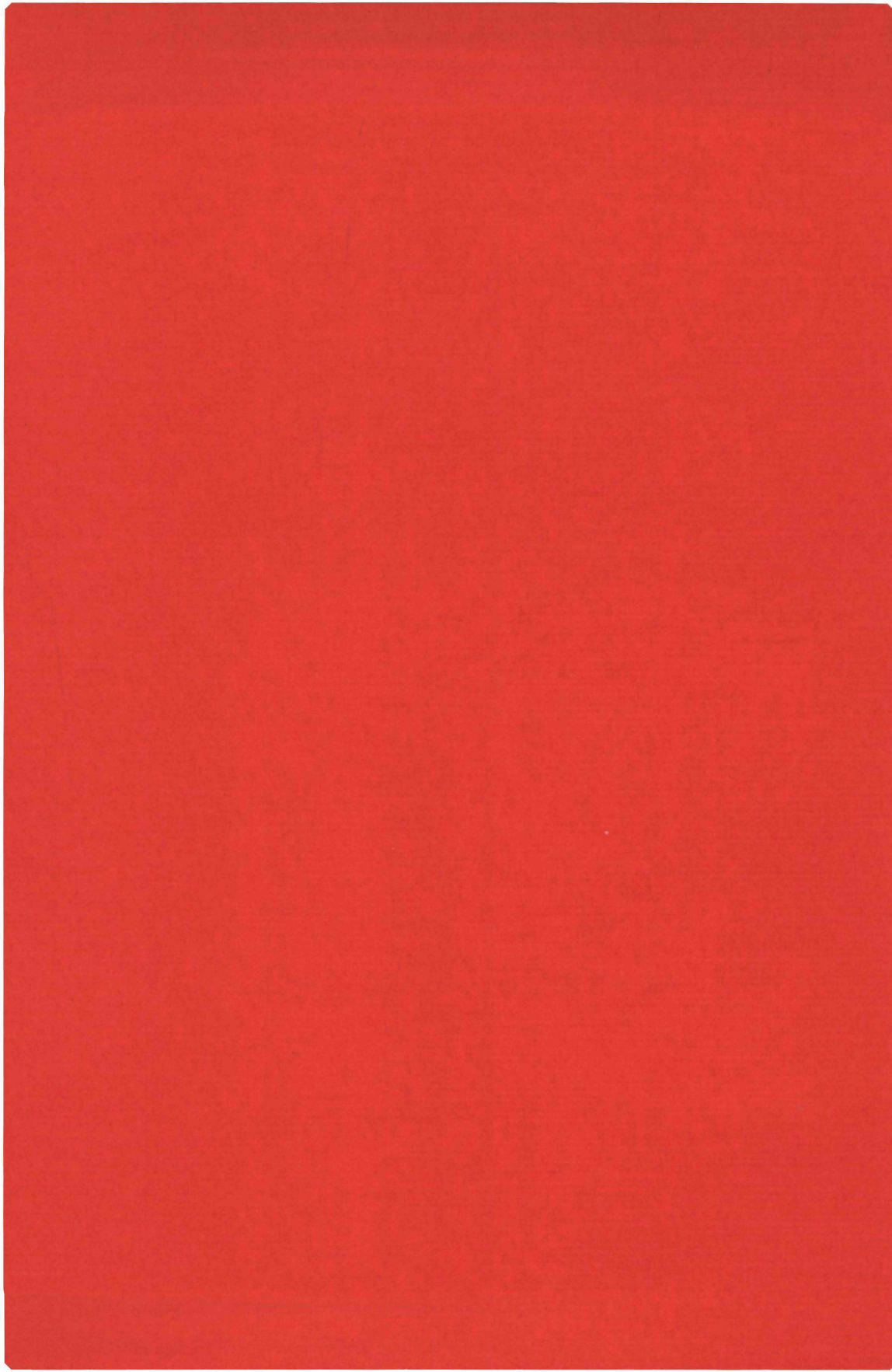
Please be advised that this information was generated on 2017-12-05 and may be subject to change.

1971

# IMMUNITEIT EN ACUTE LEUKEMIE

EEN KLINISCH EXPERIMENTEEL ONDERZOEK

G. A. M. DE VAAN



## IMMUNITEIT EN ACUTE LEUKEMIE

**PROMOTOR:**

**PROF. DR. E. D. A. M. SCHRETLEN**

# IMMUNITEIT EN ACUTE LEUKEMIE

EEN KLINISCH EXPERIMENTEEL ONDERZOEK

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE  
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN,  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS PROF. MR. F. J. F. M. DUYNSTEE  
VOLGENS HET BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DECANEN  
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN  
OP DONDERDAG 25 SEPTEMBER 1975 DES NAMIDDAGS TE 4 UUR PRECIES

DOOR

GERARDUS ANTONIUS MARIA DE VAAN

GEBOREN TE EINDHOVEN

1975

Janssen|print Nijmegen

De onderzoeken in de Hoofdstukken V en VI waren voor een belangrijk deel mogelijk door de belangeloze medewerking van de onderstaande collegae-kinderartsen, die wij hierbij onze hartelijke dank betuigen.

Mevr. Dr. H. Beekman	–	Zutphen
Mevr. Dr. M. L. M. Houben	–	Heerlen
L. T. F. Janssen	–	Eindhoven
Th. M. van der Kley	–	Maastricht
Mevr. B. M. Knape	–	Arnhem
C. E. van Marle	–	Almelo
H. A. Meurs	–	Wageningen
F. A. E. Nabben	–	den Bosch
P. P. M. Nieuwenhuis	–	Enschede
J. H. W. Pielage	–	Ede
Mevr. H. R. M. Plomp	–	Veenendaal
J. A. Rammeloo	–	Tilburg
H. L. P. Smeets	–	Oss
L. Strengers	–	Nijmegen
Mevr. W. K. Teijema	–	Almelo
A. G. W. M. Tielens	–	Eindhoven
Mevr. K. G. Tjoa	–	Zwolle
Dr. J. J. van der Vlugt	–	Deventer
J. C. C. J. A. de Vos	–	Oss
Dr. F. C. de Waal	–	Arnhem
Mevr. C. L. M. van der Zee	–	Nijmegen

## DANKWOORD

Dit proefschrift kwam tot stand in de Universiteitskinderkliniek van het St. Radboud Ziekenhuis te Nijmegen.

De auteur spreekt hierbij zijn dank uit aan zijn promotor Prof. Dr. E. D. A. M. Schretlen voor diens voortdurende belangstelling en vele adviezen bij het schrijven van dit proefschrift. Een deel van het onderzoek, vooral het onderzoek naar de iatrogene immunosuppressie vond plaats in nauwe samenwerking met Prof. Dr. G. B. A. Stoelinga. Voor zijn kritische opmerkingen bij het opzetten van een aantal onderzoeken ben ik hem zeer erkentelijk. Mijn mede-bestuursleden van de N.W.L.K. bedank ik hartelijk voor de toestemming om enkele gegevens van de werkgroep te mogen vermelden. Eveneens moet op deze plaats ook onze dank worden geuit voor de collegae Dr. J. Nagel, R.I.V., Bilthoven en Dr. G. C. J. van der Ploeg, bacterioloog, St. Radboud Ziekenhuis, alhier, voor hun medewerking aan een deel van het onderzoek.

Zeer op prijs heb ik ook gesteld de belangeloze medewerking van vele collegae-kinderartsen in Zuid-Oost Nederland; zonder deze coöperatie had het onderzoek veel beperkter moeten blijven. Dank zij de medewerking van Prof. Dr. C. A. M. Haanen konden ook een grote reeks volwassen patiënten onderzocht worden.

De zorg en toewijding aan de vele laboratorium-onderzoeken besteed door de analystes Mw. G. van de Poel-Lucassen, Mej. I. Carpay en Mej. W. Nillissen mogen hier ook met dank worden gememoreerd.

Door bemiddeling van Dr. P. J. J. van Munster werden de kwantitatieve bepalingen van immuunglobulinen verricht waarvoor ik hier mijn dank uitspreek. De verpleegkundige zorg en toewijding mogen hier zeker ook niet onvermeld blijven; hierdoor werd het ziekenhuisverblijf van de onderzochte patiënten maximaal verlicht. Mede dank zij hun toewijding die door de ouders ook werd opgemerkt waren deze steeds bereid hun medewerking aan door ons verrichte onderzoeken te verlenen. Het bovenstaande geldt evenzeer voor alle collegae die bij de behandeling betrokken zijn geweest.

Op deze plaats wil ik verder met dank vermelden de zorg besteed aan het uittikken van de vele voorlopige en de uiteindelijke definitieve versie van dit proefschrift door Mej. G. L. M. Gommans en Mw. C. G. M. Beumer-Sluis. De heer A. T. A. Reynen, afd. Medische Fotografie, zeg ik mijn dank voor het bemiddelen bij het drukken van dit proefschrift. De heer R. L. Mc. Shine heeft met zorg de Engelse samenvatting van batavismen ontdaan, waarvoor ik hem zeer erkentelijk ben.

Tenslotte wil ik twee personen nog afzonderlijk vermelden. In de eerste plaats de zeer ervaren Hans Reerink. Beste Hans, jarenlang ben jij een van de grootste kenners geweest van de leukemie bij het kind. Jij hebt zonder twijfel bij mij een grote interesse en nieuwsgierigheid gewekt voor deze merkwaardige groep van ziekten.



In de tweede plaats Dr. J. A. J. M. Bakkeren. Beste Jan, dank zij onze jarenlange samenwerking is dit werk tot stand gekomen. Al het experimentele werk is in feite het resultaat van een coöperatie waarbij elk een van ons beiden zijn inbreng had. Je nauwgezetheid en kritische zin zijn steeds onontbeerlijk geweest.

Voor de goede zorgen besteed aan de uiteindelijke vormgeving door de Fa. Janssen|print, Nijmegen, betuig ik op deze plaats mijn hartelijke dank.

Nijmegen

Zomer 1975

*Aan mijn zusje Ria*

# INHOUD

## INLEIDING

1

### HOOFDSTUK I

#### Algemene beschouwingen over de etiologie van de acute leukemie

Inleiding . . . . .	4
1. Chromosomale afwijkingen en acute leukemie . . . . .	5
2. Ioniserende straling als luxerend moment . . . . .	6
3. Familiare en hereditaire factoren . . . . .	7
4. Infectieuze en immunologische factoren . . . . .	9
Conclusie . . . . .	15

### HOOFDSTUK II

#### Mogelijke betrekkingen tussen immunologische dysfunctie en de genese van de acute leukemie

Inleiding . . . . .	16
1. Congenitale immuundeficiëntie en iatrogene immuunsuppressie . . . . .	16
2. Incidentie, leeftijds- en geslachtsverdeling van acute leukemie en lymfoproliferatieve aandoeningen . . . . .	17
3. Het verband tussen infecties en de ontstaanswijze van acute leukemie . . . . .	22
4. Beschouwingen omtrent de genese van de acute lymphoblastaire leukemie . . . . .	23
5. Acute lymfoblastaire leukemie, relaties met de opbouw van het immunologische geheugen en een mogelijke virale genese . . . . .	26
Conclusie . . . . .	27

### HOOFDSTUK III

#### Immunologische/infectieuze factoren in de levensloop van kinderen met acute leukemie

Inleiding . . . . .	29
1. Moederlijke factoren in de genese van de acute leukemie bij kinderen . . . . .	29
2.1. Infecties zonder aanwijsbare oorzaak . . . . .	33
2.2. Verband met het Epstein-Barr virus en acute leukemie . . . . .	35
3. Stoornissen in de immuniteit bij kinderen lijdende aan acute leukemie . . . . .	36
Conclusie . . . . .	43

### HOOFDSTUK IV

#### De toepassing van cytostatica en corticosteroiden bij de acute leukemie en haar relatie tot infecties, in het bijzonder tot waterpokken

Inleiding . . . . .	45
1. Waterpokken en acute leukemie . . . . .	46
2. De invloed van antileukemische therapie op het verloop van varicella . . . . .	46
3. Eigen waarnemingen van varicella-herpes zoster infecties tijdens anti-leukemische therapie . . . . .	49
4. Behandeling van waterpokken en gordelroos tijdens een acute leukemie . . . . .	54
5. De rol van gammaglobuline in de preventie en therapie van varicella-herpes zoster-virus infecties . . . . .	56
Conclusie . . . . .	58

#### HOOFDSTUK V

Immuunsuppressie als gevolg van antileukemische therapie, pogingen tot kwantificering

Inleiding . . . . .	60
1. Infecties tijdens de behandelingsperiode van de acute leukemie . . . . .	61
2. De normale afweer tegen micro-organismen . . . . .	62
3. Enkele literatuurgegevens omtrent de immuunsuppressieve werking van de antileukemische therapie . . . . .	68
4. Eigen onderzoek . . . . .	72
4.1. Het verloop van de PHA stimulatie van lymfocyten tijdens onderhoudstherapie en consolidatiekuren volgens Mathé c.s. (1967) . . . . .	73
4.2. Het verloop van antilichaamtiter en de in vitro stimulatie van bloedlymfocyten door antigenen na booster vaccinatie met D.T.P. vaccin . . . . .	76
4.3. Het verloop van de in vitro stimulatie van lymfocyten op specifieke mitogenen, 'memory'-antigenen en een constant aanwezig antigeen tijdens consolidatie en onderhoudstherapie volgens protocol A.L.L.-2-1973 N.W.L.K. . . . .	80
5. Beschouwingen over de resultaten van de eigen onderzoeken . . . . .	87
Conclusie . . . . .	88

#### HOOFDSTUK VI

De aard van de prolifererende cel bij acute lymfoblastaire leukemie. Celkinetische verschillen tussen acute lymfoblastaire leukemie en acute myeloïde leukemie

Inleiding . . . . .	89
1. De ontwikkeling van T- en B-lymfocyten . . . . .	90
2. De eigenschappen van rijpe T- en B-lymfocyten . . . . .	91
3. Kenmerken van T- en B-lymfocyten van de maligne cel bij lymfoproliferatieve aandoeningen en bij leukemieën . . . . .	92
4. Eigen onderzoek . . . . .	97
4.1. Vraagstelling . . . . .	97
4.2. Onderzoek bij patiënten lijdende aan A.L.L. . . . .	97

4.3. Onderzoek bij patiënten lijdende aan A.M.L. . . . .	102
5. Bespreking van de resultaten der onderzoeken vermeld sub 4, mede in het licht van literatuurgegevens . . . . .	103
Conclusie . . . . .	111
HOOFDSTUK VII	
METHODIEKEN . . . . .	113
SAMENVATTING/SUMMARY . . . . .	117
LITERATUUR . . . . .	123

Leukemieën zijn ziekten waarvan de etiologie onbekend is en die gekenmerkt worden door een abnormale en wijdverspreide proliferatie van leucocyten die het beenmerg en andere delen van het lichaam infiltreren. Daarbij kunnen afwijkende cellen in het bloed verschijnen. Slechts zelden betreft dit een proliferatie van erythroblasten en megakaryocyten. Deze omschrijvende definitie wordt gegeven door de Gruchy (1966) en is nog steeds bruikbaar. Hij voegt er aan toe dat deze ziekten steeds fataal verlopen, behalve bij de chronische lymfatische leukemie, waarvan het beloop zo langdurig kan zijn, dat de lijder overlijdt aan een niet verwante ziekte.

Het begint er op te lijken dat de acute lymfoblasten leukemie – bij het kind althans – niet perse fataal hoeft te zijn. Sinds het begin van de chemotherapie rond 1950 met corticosteroiden en foliumzuurantagonisten tot heden, is de levensduur steeds meer verlengd bij dit type leukemie.

Deze gunstige resultaten bij de behandeling bij de acute lymfoblasten leukemie (A L L) gaan niet gepaard aan even gunstige bij de acute myeloïde leukemie (A M L) waar de vooruitgang t a v therapie resultaten helaas veel bescheidener zijn. De duidelijk zichtbare vooruitgang heeft enerzijds de wetenschappelijke belangstelling gestimuleerd, anderzijds bleken er nieuwe, of althans nu duidelijker geprononceerde complicaties en aspecten een grotere rol te gaan spelen. Voorbeelden hiervan zijn de stollingsafwijkingen, vooral geconstateerd bij de A M L van het granulocytair type en de neurologische verwickelingen die steeds meer aandacht vragen (de Vaan 1974).

Van groot belang zijn ook de immunologische aspecten, zowel t a v de ontstaanswijze, de remissieduur, de rechute en de infectieuze complicaties in alle stadia van de ziekte. Verder lijken zij van belang te zijn voor de therapie (Mathe c s, 1967, 1968, Southam, 1967, Crowther c s, 1973). Deze aspecten zijn overigens van geheel uiteenlopende aard en zullen in het kort hier gememoreerd worden.

1 Immunotherapie hierbij beoogt men door middel van immunologische mechanismen leukemische cellen te doen verdwijnen. Dit veronderstelt als primair gegeven dat leukemische cellen antigenen dragen, die voor de patient als vreemd ervaren worden. Hoewel dit bij de mens al aangetoond is (voor een overzicht zie Viza 1972), is het immunologische antwoord op deze antigenen onvoldoende en/of ineffektief zodat kunstgrepen moeten worden toegepast om dit antwoord te versterken en effectiever te maken. Mathe c s (1968) stimuleerden de celgebonden immuniteit door herhaalde B C G -vaccinaties.

Bij de A M L zagen de britse onderzoekers enig effect van deze vaccinaties, gecombineerd met injecties met bestraalde en dode leukemische cellen (Crowther c s 1973). De hoop is gevestigd op het feit, dat althans in dierproeven, het lichaam via immunologische mechanismen in staat is om

een zeer klein aantal leukemische cellen geheel te doen verdwijnen. De celgebonden, thymusafhankelijke immuniteit zou hiervoor verantwoordelijk zijn en de humorale immuniteit zou zelfs averechts kunnen werken (Alexander 1974). Bij de mens moet eerst de leukemische massa tot een uiterst kleine omvang worden teruggebracht door chemotherapie (Mathé c.s. 1968, Crowther, 1973).

2. Indien immunotherapie klinisch belangrijk zou worden, is het nodig om zo goed mogelijk geïnformeerd te zijn over cellulaire immuniteit bij patienten lijdende aan acute leukemie.

Burnet (1970) heeft het begrip immuno-surveillance ingevoerd; hij veronderstelt dat een begin van de ontspoorde groei door het lichaam herkend wordt. De afwijkende, nieuw gevormde cellen dragen nieuwe antigenen en wekken een efficiënt immuunantwoord op.

Bij het ouder worden komen zonder twijfel maligne nieuwvormingen vaker voor; of dit (alleen) te wijten is aan een in langzame mate toenemend falen van het immuunapparaat is bepaald (nog) niet volledig opgehelderd (Laroye 1973).

Zeker is het waar dat bij congenitale immuun-deficientie-syndromen en ook bij chronisch gebruik van corticosteroiden en cytostatica maligne proliferaties vaker voorkomen. Het betreft dan vaak maligne reticulosen of maligne lymfomen. T.a.v. deze uiteenlopende aspecten is het zinvol om na te gaan hoe het met de cellulaire immuniteit is gesteld bij patienten vóór en na een geslaagde remissiepoging.

Parameters voor deze kant van de immuniteit zijn proeven waarbij in vitro bloedlymfocyten worden gestimuleerd door aspecifieke mitogenen of door antigenen.

3. De clinicus wordt bij behandeling van leukemie patienten regelmatig geconfronteerd met infecties door micro-organismen die bij gezonde leeftijdsgenoten in veel geringere frekwentie voorkomen, vaak subklinisch of zeer licht verlopen of waarbij deze micro-organismen zich slechts als commensalen op de uitwendige en inwendige oppervlakten ophouden. Voor de kinderarts is in dit verband de waterpokken bij deze patienten een belangrijke ziekte geworden. In dit proefschrift zal deze infectie afzonderlijk worden besproken, niet omdat andere infecties niet ernstiger zijn, maar omdat het beeld van de 'normale' infectie goed bekend is. Bovendien zijn er enkele aspecten die therapeutisch beïnvloedbaar zijn maar waarover de meningen uiteenlopen.

4. De etiologie van de leukemie is onbekend, een stap in die richting zou kunnen zijn het ophelderen van de aard en afkomst van de leukemische cellen. Bij de myeloïde beelden wijst de morfologie en de cytochemie op de relatie tot normale elementen van de granulocyto- en monocytopenese. Bij de chronische lymfatische leukemie (C.L.L.) zijn de overeenkomsten tussen de proliferende cellen en de normale bursaafhankelijke 'B-lymfocyten' duidelijk aangetoond.

De myeloïde leukemische cellen hebben bepaalde functies zoals bijv. fagocytose in zekere mate gemeen met de normale granulocyten. De acute lymfatische c.q. acute ongedifferentieerde of stamcel-leukemie heeft namen

die een uiteenlopende aard veronderstellen van de prolifererende cel. Het functioneel nader omschrijven van deze cellen zal kunnen leiden tot een juistere benaming en mogelijk mede een bijdrage zijn tot het ophelderen van de etiologie en aard van dit type leukemie.

5. I.v.m. de eventuele integratie van chemotherapie en immunotherapie in een behandelingsplan is kennis van de immuunstatus bij patienten die behandeld worden met cytostatica en corticosteroiden van belang. Tevens zou het wenselijk zijn in verband met een verhoogd infectierisico door neutropenie en lymphopenie ook passende, andere parameters voor de immuniteit te hebben. Onopgelost is de vraag of het therapie effect samenhangt met de immuunstatus van de patient. Dit complex van redenen betekent dat het nuttig kan zijn om meer te weten van het verloop van de immuniteit tijdens de onderhoudstherapie.

Immuniteit is, zoals alle biologische fenomenen, schier oneindig complex. De clinicus zal dus slechts een fractie van een fractie kunnen onderzoeken. In dit proefschrift zullen t.a.v. de immunologische aspecten slechts enkele ter sprake komen. Er zal o.a. niet verder gesproken worden over de mérites van immunotherapie. De volgende aspecten van de immuniteit bij de acute leukemie zullen wel ter sprake komen: Er zal uitvoerig ingegaan worden op het al of niet aanwezig zijn van immunologische tekortkomingen, die de kans op het ontstaan van acute leukemie zouden kunnen verhogen (Hoofdstuk II en III). De gevolgen van de iatrogene immuunsuppressie worden aan de hand van een klinisch voorbeeld geadstrueerd (Hoofdstuk IV). Het ontbreken van een goede mogelijkheid tot het kwantificeren van immuunsuppressie door de therapie wordt in Hoofdstuk V beschreven. Tenslotte worden in Hoofdstuk VI waarnemingen vermeld die geleid hebben tot een nauwkeuriger begrip van de aard van de prolifererende cel bij de A.L.L. Tevens wordt in dat hoofdstuk duidelijk gemaakt dat de A.L.L. en de A.M.L. wezenlijke andere ziekten zijn.



## ALGEMENE BESCHOUWINGEN OVER DE ETIOLOGIE VAN DE ACUTE LEUKEMIE

## INLEIDING

In de definitie van leukemie, gegeven in het voorwoord, wordt een omschrijving van de oorzaak weggelaten, omdat hierover nog niets met zekerheid bekend is. Er zijn toch wel een aantal gegevens en vermoedens waardoor wij enige ideeën hebben t.a.v. de ontstaanswijze. Zo komen bij zeer uiteenlopende diersoorten (muizen, runderen, kippen, katten) leukemieën voor waarbij een virale oorzaak met zekerheid is bewezen. Afhankelijk van de onderzochte diersoort worden daarbij meer klassiek leukemische beelden ofwel meer tumoreus leukemische of andere lymfoproliferatieve manifestaties gevonden. Bovendien zouden uiteenlopende vormen van acute leukemie door een en hetzelfde virus veroorzaakt kunnen worden. De wijze waarop deze virussen aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van maligne aandoeningen is ook in het dierexperiment nog geenszins geheel duidelijk.

Bij de mens zijn er wel aanwijzingen voor een virale etiologie, maar een duidelijk oorzakelijk verband is (nog) niet aangetoond. Volgens Zuelzer en Cox (1969) zijn er bovendien sterke aanwijzingen, dat de leukemieën van de mens in drie onderling niet verwante hoofdvormen voorkomen: chronisch myeloide, chronisch lymfatische en acute leukemie. Een enkelvoudige etiologie voor alle leukemieën wordt daardoor onwaarschijnlijk. De kliniek, leeftijdsverdeling en vooral de therapiemogelijkheden van de twee belangrijkste typen van de acute leukemie: de lymfoblastaire en myeloide vorm zijn zeer verschillend. Desondanks zouden zij naar analogie van de situatie bij het dier ook bij de mens etiologisch toch bij elkaar kunnen horen.

In dit kader valt ook te memoreren, dat bij een op zich geheel andere ziekte, nl. de M. Hodgkin bij de jongere leeftijdsgroep (omvattende kinderen en jonge volwassenen) een andere primaire lokalisatie en histologie gewoonlijk gezien worden dan bij de groep patiënten, ouder dan 50 jaar (Smithers 1970). De lymfoblastaire vorm van acute leukemie wordt vooral bij kinderen en adolescenten gezien, i.t.t. de myeloide vormen, die bij de oudere groep patiënten duidelijk overheerst. Het is dus niet ondenkbaar, dat één ziekte-oorzaak c.q. ziekmakend agens zich manifesteert op uiteenlopende wijzen c.q. met verschillende ziektebeelden. Bijvoorbeeld bij trisomie 21 patiënten, ouder dan 1 jaar, blijkt dat de A.M.L. en A.L.L. in ongeveer dezelfde onderlinge verhoudingen voorkomen als bij normale kinderen, (Rosner en Lee 1972).

De frekwentie van de acute leukemie is bij kinderen met een trisomie 21 ongeveer 20 maal hoger dan bij hun leeftijdsgenoten (Weisgerber c.s.

1971). Dit betekent, dat bij deze groep kinderen de frekwenties van zowel de acute myeloïde als van de acute lymfoblastaire vorm van leukemie in gelijke mate verhoogd zijn, vergeleken met de frekwentie van deze twee typen van acute leukemie bij normale kinderen.

Dit zou een argument kunnen zijn voor de veronderstelling, dat de acute leukemie nosologisch één eenheid is. De tijd zal echter moeten leren of bij de mens de acute leukemie niet een syndroom is, zoals de nefrose en de epilepsie, met zeer uiteenlopende oorzaken en luxerende momenten. Een aantal van de factoren, die etiologisch van belang kunnen zijn moge hier in het kort besproken worden. Deze factoren hangen ten dele onderling nauw samen en een afzonderlijke bespreking lijkt daardoor wat kunstmatig aan te doen. Voor de overzichtelijkheid zal de onderstaande, enigszins willekeurige, indeling en volgorde gebruikt worden:

1. Chromosomale afwijkingen
2. Ioniserende straling als luxerend moment
3. Familiaire en hereditaire factoren
4. Infectieuze en immunologische factoren
5. Samengaan met andere afwijkingen en ziekten.

#### 1. CHROMOSOMALE AFWIJINGEN EN ACUTE LEUKEMIE

De frekwentie van voorkomen van acute leukemie is bij kinderen, lijdende aan het syndroom van Down (trisomie 21) beduidend veel hoger. De kans op het ontstaan van deze aandoening is bij de groep patiënten ongeveer 20 maal groter dan normaal (Fraumeni 1968, Weisgerber 1971). Ook onze ervaringen zijn hiermee in overeenstemming; bij 124 kinderen met acute leukemie werd 5 maal dit syndroom waargenomen. In de literatuur heb ik geen publicaties gevonden waaruit blijkt, dat ook bij oudere patiënten met een Down-syndroom van bijvoorbeeld 20 tot 40 jaar, acute leukemie vaker voorkomt dan bij de chromosomaal normale leeftijdsgenoten.

Een aantal ziekten, die gepaard gaan met een groot aantal chromosomenbreuken zouden predisponeren voor acute leukemie. Schroeder en Kurth (1971) noemen daarbij de Fanconi-anemie, ataxia teleangiectasia, de glutathionreductase deficiëntie en de congenitale agranulocytose van Kostmann. Bij de verworven B<sub>12</sub> deficiëntie zouden ook meer chromosomenbreuken ontstaan en zou de acute leukemie meer voorkomen. Volgens Rees (1964) zou een iatrogene folinezuurdeficiëntie, door o.a. methotrexaat, de kans op een acute leukemie verhogen. Dit wordt mogelijk geluxeerd doordat als gevolg van deze therapie, chromosomale afwijkingen zouden ontstaan.

De waarnemingen van Zuelzer en Cox (1969) zijn hiermee echter in tegenspraak. Bij de door hen onderzochte kinderen, die tijdens de remissie van de acute leukemie werden bestudeerd, was het aantal chromosomale breuken niet verhoogd, vergeleken met de controle groep. Omdat men mag aannemen, dat deze kinderen allen cytostatica, waarbij zeer vaak het methotrexaat, al geruime tijd hebben gebruikt, ten tijde van het onderzoek, wordt door deze bevindingen de suggestie van Rees (1964) onwaarschijnlijk. Om een indruk te krijgen van de frekwentie van voorkomen van

chromosomale afwijkingen bestudeerden deze onderzoekers bij 206 kinderen tijdens de remissie van de acute leukemie de karyogrammen. Bij 6 kinderen werd de klinische diagnose trisomie 21 bevestigd, bij slechts 6 van de overige 200 kinderen bleken de karyogrammen geringe afwijkingen te vertonen. In de controle groep van 102 klinisch normale kinderen werden géén afwijkingen geconstateerd. Dit onderzoek wijst er dus op dat, althans bij kinderen, chromosomale afwijkingen (uitgezonderd trisomie 21) geen belangrijk predisponerend moment vormen. Ons inziens is bij kinderen een chromosomaal onderzoek dan ook zelden aangewezen, behalve voor de nadere differentiaal diagnostiek van de chronische myeloïde leukemie. Op de kinderleeftijd komen hiervan immers twee vormen voor: een infantiele vorm met een sterk verhoogd gehalte aan foetaal hemoglobine maar zonder chromosomale afwijkingen en de volwassen vorm, waarbij zowel bij kinderen als ouderen vaak het zogenaamde Philadelphia-chromosoom wordt gevonden (Weisgerber 1972).

## 2. IONISFREDE STRALING ALS LUXEREND MOMENT

Deze verhoogt zonder enige twijfel de kans op maligne proliferatie van allerlei aard en zeker ook de kans om een acute leukemie te ontwikkelen. Dit is mijns inziens ook voor de laatstgenoemde ziekten, nog eens overduidelijk gebleken uit de na-onderzoeken van de bevolking van Nagasaki en Hiroshima. Twintig jaar na de atoombombombardementen waren de frequenties van acute leukemie in deze steden nog steeds excessief (Fraumeni 1969). Gibson c.s. (1968) vermelden, naar aanleiding van een retrospectief onderzoek, dat röntgenstraling vóór de conceptie en tijdens de graviditeit in zeer geringe mate de kans op het ontstaan van acute leukemie bij het kind kunnen verhogen (zie hoofdstuk II).

Een zeer uitgebreid prospectief onderzoek werd verricht door Diamond c.s. (1973). Ongeveer 10.000 blanke en 10.000 zwarte kinderen, geboren tussen 1947 en 1959 werden opgespoord tussen 1961-1967. Deze kinderen waren allen, wegens diagnostische procedures, zoals galblaasfoto's, intraveneuze pyelogrammen enz. bij de moeder, in utero blootgesteld aan röntgenstraling. De controlegroepen waren ongeveer dubbel zo groot. Bij de blanke 'röntgengroep' werd 6 maal een leukemie gezien; bij de dubbel zo grote controlegroep werd dit slechts 4 maal waargenomen. Bij de zwarte kinderen waren deze getallen respectievelijk 0 en 3. Hoewel dus door dit onderzoek een verband, bij de blanke kinderen, wel waarschijnlijk wordt gemaakt, blijft de feitelijke kans dus nog steeds zeer klein. Volgens Mole (1974) is de kans dat een acute leukemie zich in de eerste tien levensjaren ontwikkelt ongeveer 50% hoger indien het kind in utero aan ioniserende straling werd blootgesteld.

Concluderend mag men dus zeggen, dat ioniserende straling vóór de conceptie in relatieve zin sterk kans-vergroterend werkt. Maar de absolute frequentie blijft nog steeds vrij laag bij kinderen die hieraan antenataal werden blootgesteld. Diagnostische procedures tijdens de zwangerschap waarbij ioniserende straling wordt gebruikt, zouden de kans op een acute leukemie bij blanke kinderen dus 1,5 (Mole 1974) tot 2 à 3 maal (Diamond

c.s. 1973) kunnen verhogen. Gezien de feitelijk toch zeer lage frekwentie van spontane acute leukemie bij het kind en de zeer uiteenlopende doses bij zeer uiteenlopende diagnostische onderzoeken is het bij de individuele patiënt en zijn moeder eigenlijk niet te zeggen, wat retrospectief een bepaald röntgenonderzoek bijgedragen heeft bij het tot uiting komen van een acute leukemie.

### 3. FAMILIAIRE EN HEREDITAIRE FACTOREN

Bij de analyse van factoren die een familiair voorkomen bepalen dient men enkele verschillende aspecten te onderscheiden:

3.1. de zuiver genetische aspecten: bepaalde afwijkende genen verhogen de kans op het ontstaan van bepaalde ziekten, i.c. acute leukemie.

3.2. de omgevingsfactoren, voedingsgewoonten en dergelijke, die voor familieleden onderling meer overeenkomsten vertonen dan bij een groep willekeurige niet verwante personen.

3.3. niet genetisch bepaalde stoornissen, zoals bepaalde afwijkingen of ziekten van de moeder, (bijvoorbeeld een vitium cordis, nierziekten, enz.), die in utero voor elk kind een negatief effect kunnen hebben of, bijvoorbeeld infecties die van moeder op kind kunnen worden overgedragen.

*Ad. 3.1.* Ten aanzien van de genetische factoren kan het van belang zijn om óók de frekwentie van andere bloedziekten met een maligne proliferatie in de verdere familie na te gaan.

Zich beperken tot acute leukemie bij ouders of broers en zusters levert weinig gegevens op. Ons is persoonlijk geen enkel geval bekend waarbij meer dan 1 kind van het gezin aan acute leukemie leed of heeft geleden. De geringe frekwentie waarin dit voorkomt blijkt ook wel uit de uitgebreide literatuuroverzichten van Zuelzer en Cox (1969) en Keith en Brown (1971). Eerstgenoemden konden slechts 102 gezinnen in de literatuur terugvinden waarbij 2 of meer gezinsleden aan leukemie hadden geleden. Tweelingen waren niet in hun onderzoek betrokken. Bij 41 gezinnen was het retrospectief niet op te maken om welke combinatie van leukemievormen het ging. De geringe frekwentie van ongelijke combinaties wijst er op, dat deze ziekten onderling niet verwant zijn. In dit verband moge vermeld worden, dat in Nederland onlangs nog een familie is beschreven waarin 5 broers en zusters aan chronische lymfatische leukemie (C.L.L.) leden (Schweitzer, 1973). Iversen (1966) vond bij ruim 500 kinderen met een acute leukemie, dat slechts tweemaal twee kinderen uit één gezin hieraan hadden geleden.

Volgens Miller (1967) zou in de Verenigde Staten de kans dat bij blanke kinderen in een tijdsverloop van 10 jaar een acute leukemie ontstaat 1 op 2880 zijn, bij 'sibs' van deze patiënten zou de kans 4 maal groter zijn en dus nog steeds slechts 1 op 720. Indien erfelijke factoren van gróót belang zijn mag men verwachten, dat de feitelijke kans veel groter is dan 1 op 720 in een tijdsverloop van 10 jaar.

Ook de gegevens van Steinberg (1960) wijzen er op, dat genetische factoren niet een belangrijke rol kunnen spelen, gezien de feitelijke frekwen-

tie van acute leukemie bij andere bloedverwanten dan sibs van kinderen lijdende aan deze ziekte. De samenvatting van het artikel van Rigby c.s. (1966) suggereert misschien dat leukemieën frekwenter voorkomen bij bloedverwanten van acute leukemie patiënten. Bij het doorlezen v hun bevindingen wordt dit echter toch wel onzeker.

Ten aanzien van het voorkomen van leukemie bij tweelingen gingen Keith en Brown (1971) de literatuur na van 1927 tot 1970. Zij vonden 62 gevallen waarbij beide partners aan acute leukemie hadden geleden (zie tabel I-1).

TABFI I-1 *Leukemie bij tweelingen (Keith en Brown 1971)*

Leeftijd <sup>1</sup>	MZ <sup>2</sup>	HZ <sup>3</sup>	onbekend	totaal
< 1 jaar	11	2	2	15
1- 6 jaar	11	8	7	26
6-14 jaar	6	1	2	9
14-64 jaar	10	2	-	12
Totaal	38	13	11	62

1 = leeftijd waarop de eerste partner ziek werd.

2 = monozygote tweeling.

3 = heterozygote tweeling.

Gezien de betrekkelijk lage frekwentie van acute leukemie bij kinderen vergeleken bij volwassenen, is het extra opvallend, dat in deze groep van tweelingen juist over zoveel zugelingen en kleuters is bericht. Bij 7 paren zugelingen werd bij de partner gelijktijdig of binnen 1 maand de diagnose akute leukemie gesteld. Het is niet ondenkbaar, dat in deze groep de ziekte bij een van de twee intra-uterien is begonnen en deze de andere partner in deze periode heeft besmet. De andere mogelijkheid, dat beiden tegelijk ziek werden, maar er slechts een verschil in tijdstip was van het manifest worden van de ziekte, is niet uitgesloten.

Om een indruk te geven over de frekwentie waarin de familie-anamnese positief is, worden de eigen gegevens vermeld bij 124 kinderen met acute leukemie.

TABEL I-2 *Voorkomen van maligne beenmergziekten bij bloedverwanten van kinderen lijdende aan A L (Universiteitskinderkliniek, Nijmegen 1966 t/m 1974)*

generatie 1 (broers, zusters, cousins van patient): 2 x neefje, 1 x nicht, 1 x achternicht.

generatie 2. (ouders van patient, hun broers, zusters en cousins): 2 x zuster van moeder, 1 x 1 broer van vader, 1 x 2 broers van vader, 3 x cousin(e) van moeder, 2 x cousin(e) van vader

generatie 3: (grootouders van patient, hun broers, zusters) 1 x broer van grootmoeder, 'beenmergkanker' (FMM), 1 x grootmoeder (MM) M Kahler.

Eén patiënte had een broertje gehad dat aan een Wilms-tumor is overleden. Eén moeder was tijdens de zwangerschap nauw betrokken geweest bij de verpleging van haar neefje, lijdende aan een acute myeloide leukemie. Vijf jaar later ontstond bij haar toen 5-jarig dochttertje een acute lym-

foblastaire leukemie. Wij durven aan onze gegevens geen betekenis te hechten, maar willen ze wel vermelden in het kader van de gegevens van Righy (1966).

Al deze gegevens, betreffende het voorkomen van acute leukemie in gezinnen, verdere bloedverwanten en tweelingen, wijzen er op dat genetische factoren bij de acute leukemie slechts een ondergeschikte rol spelen, c.q. de betreffende factoren slechts in zeer geringe mate bijdragen tot het manifest worden van deze ziekte. Of een onderzoek naar frekwentie van voorkomen van ook andere ziekten uit de groep van maligne lymfoproliferatieve ziekten in de verdere familie meer aanknopingspunten zou kunnen bieden, is een nog onopgeloste vraag.

*Ad. 3.2.* Voorzover mij bekend, zijn hierover nauwelijks exacte gegevens bekend. Wel is een enkele maal een niet-familiaire, maar plaatsgebonden 'clustering' beschreven. (Heath c.s. 1963).

Of deze sporadische bevinding niet alleen door het toeval verklaard mag worden is voorlopig een open vraag.

*Ad. 3.3.* Dat bij meerdere kinderen van één moeder een leukemie ontstaat, lijkt zoals boven beschreven is, uiterst zeldzaam, en mogelijk door het toeval bepaald. Een infectieuze genese wordt wel gesuggereerd. In utero verloopt de afweer tegen infecties anders dan na de geboorte. De kliniek van bijvoorbeeld de intra-uteriene rubeola en toxoplasma infecties laat dit duidelijk zien. Het is verder ook zeer wel mogelijk, dat een virus in utero geen onmiddellijk manifeste ziekte behoeft te veroorzaken, maar via beïnvloeding van chromosomale structuren enkele jaren later een leukemie tot uiting laat komen.

De aanwijzingen die er zijn dat acute leukemie bij het kind een gevolg kan zijn van een virale infectie c.q. een abnormale reactie hierop, worden in het volgende hoofdstuk besproken. Van de niet genetische factoren, die wel van belang kunnen zijn, bij een eventueel familiair optreden noemen Gibson c.s. (1968) naast blootstelling van de moeder aan ioniserende straling vóór de conceptie en tijdens de graviditeit (zie I.2.), verder ook miskramen en doodgeboorten bij de moeder.

Tot een zeer hoge frekwentie van leukemie bij broers en zusters leidt dit kennelijk echter niet, gezien de zeldzaamheid van een dergelijk familiair optreden.

#### 4. INFECTIEUZE EN IMMUNOLOGISCHE FACTOREN

Omdat bij zoogdieren en vogels leukemieën zeker wel te wijten zijn aan infecties met oncogene virussen, is het a priori zeer goed mogelijk dat virussen ook bij de mens een grote rol spelen in de genese van leukemie. Bij elke maligne groei ontstaat een woekering en ongebreidelde proliferatie van bepaalde min of meer gedifferentieerde en morfologisch-functioneel min of meer afwijkende cellijnen. Volgens de immunosurveillance hypothese van Burnet (1970) worden afwijkende cellen, die een ongecontroleerde groei gaan vertonen door immunologische mechanismen geëlimineerd. Een manifest geworden maligne aandoening betekent dan een falen van deze immunosurveillance. In het volgende hoofdstuk zal nog uit-

voerig op het verband tussen immuniteit en acute leukemie worden ingegaan. Enkele facetten in de infectieuze en immunologische sfeer zullen nu worden besproken.

#### *4.1. Virale infecties en acute leukemie*

Aanwijzingen voor een infectieus agens zouden geleverd kunnen worden door een histologisch-microscopisch, cellulair-electronen-microscopisch en serologisch onderzoek. Onomstotelijk is echter met name een virale genese bij de mens geenszins bewezen. Omdat zulks echter bij vogels en bij zeer uiteenlopende zoogdiersoorten wel aangetoond is, lijkt het echter geenszins uitgesloten, dat dit bij de mens toch óók het geval zal blijken te zijn. De aanwijzingen hiervoor zullen echter in een andere context besproken worden in het volgende hoofdstuk.

Epidemiologische onderzoeken (Iversen 1966, Lingeman 1968, Fraumeni 1969) laten in het algemeen niet zien dat de frekwentie van acute leukemie op bepaalde tijden en plaatsen veel hoger is. Een zeer lange incubatietijd en/of een zeer grote ongevoeligheid van de bevolking voor het agens kunnen echter ook een verklaring zijn voor het negatief uitvallen van epidemiologische onderzoeken. De combinatie van een lange incubatietijd en de geringe ontvankelijkheid bestaat mogelijk ook bij de M. Hodgkin, waarbij wel een ophoping in tijd en plaats is gevonden (Vianna c.s. 1974). Het is een bekend gegeven, dat bij kinderen de acute leukemie zeer vaak voorafgegaan wordt door of gediagnostiseerd wordt naar aanleiding van een koortsende ziekte. Boyer (1973) suggereert daarom, dat de acute leukemie, het lymfosarcoom en de Burkitt-tumor bij het kind zéér zeldzame verwickelingen zijn van een ubiquitaire infectie; naar analogie met mazelen en poliomyelitis kunnen ernstige complicaties optreden zoals encephalitis, respectievelijk vernietiging van motorische voorhoorncellen bij de laatstgenoemde ziekte. Het zijn dus verwickelingen, die feitelijk slechts uiterst zelden voorkomen, omdat vrijwel iedereen deze ziekten zonder deze verschijnselen zou doormaken.

Bij het Burkitt-lymfoma en het nasofaryngeale carcinoom bestaat er een duidelijk verband tussen het Epstein-Barr virus en deze aandoeningen. De aard van deze relatie is echter nog onduidelijk. Dat dit virus bij de acute leukemie etiologisch een belangrijke rol speelt wordt blijkens de literatuur gegevens onwaarschijnlijk geacht (Langenhuysen en The 1973, Leading Article 1971, idem 1974).

#### *4.2. Leukemie antigenen*

Indien cellen leukemisch worden, ontwikkelen deze cellen nieuwe antigenen (Southam 1967, Harris 1973, Pegrum 1973).

De verwachtingen van de actieve immunotherapie (Mathé c.s. 1967, Skurkovich 1969, Crowther c.s. 1973) zijn gebaseerd op de gedachte, dat door een gerichte stimulatie van de immuniteit, immuunmechanismen, werkzaam tegen deze antigenen versterkt worden en hierdoor leukemische cellen kunnen worden geëlimineerd. De spontane afweerreactie van het lichaam hierop is kennelijk onvoldoende; ondanks de aanwezigheid van

deze leukemie-antigenen is immers het normale verloop van de onbehandelde leukemie dodelijk. Een korte bespreking lijkt in het kader van de ontstaanswijze van de leukemie hier op zijn plaats.

In 1967 vonden Doré c.s. reeds, dat bij 12 van de 41 onderzochte patiënten met een acute leukemie er aanwijzingen waren voor de aanwezigheid van antistoffen tegen leukemie-cellen. Ioanides c.s. (1968) toonden aan, dat antisera gericht tegen het voor muizen leukemogene Rauscher virus ook konden reageren met leukemische cellen van humane afkomst.

Dit kon worden bevestigd door Bates c.s. (1969), die het bovendien waarschijnlijk maakten, dat een eventueel leukemie 'antigeen' ook vrij in het plasma van acute leukemie patiënten voorkomt. Een antiserum bereid tegen plasma van acute leukemie patiënten, bleek namelijk na vele absorpties nog te kunnen reageren met menselijke leukemische cellen. Viza c.s. (1970) deden het omgekeerde: met een oplosbare fractie uit menselijke leukemie-cellen werden antistoffen bij het konijn opgewekt.

Deze antistoffen waren opgewekt tegen respectievelijk leukemische cellen en celmateriaal afkomstig van patiënten lijdende aan acute myeloïde, chronische myeloïde en chronische lymfatische leukemie. Er bleek een onderlinge kruisreactiviteit te bestaan, wijzend op overeenkomstige antigenen determinanten bij deze uiteenlopende leukemiesoorten. Deze antigenen komen dus zowel in of op leukemische cellen voor en ook vrij in het plasma.

In een autologe situatie waarbij de in ingevroren toestand bewaarde leukemische cellen in een gemengde lymfocytenkweek (M.L.C. 'mixed lymphocyte culture'), als stimulans dienden voor remissielymfocyten, bleek er stimulatie op te treden (Fridman en Kourilsky 1969).

Bach c.s. (1969) onderzochten 36 patiënten met een acute leukemie. Tijdens de remissie vonden zij, dat in gemengde lymfocyten-kweken van patiënt-broer/zuster er bij ongeveer 25% geen stimulatie werd gevonden. Dit percentage van zogenaamd M.L.C. identieke broers of zusters komt overeen met de bevindingen bij normalen. Bij 2 patiënten in rechute bleek, dat de leukemische cellen wel in staat waren de lymfocyten van M.L.C. identieke broer of zuster te stimuleren. In een ander onderzoek bij 3 paren identieke tweelingen en 1 identieke drieling waarvan steeds één partner aan acute leukemie leed (2 x A.L.L. en 2 x A.M.L.) kon in geen enkel geval stimuleerbaarheid van de normale lymfocyten door leukemische cellen in de M.L.C. aangetoond worden (Rudolph c.s. 1970). Han en Wang (1972) vonden echter wel stimulatie door leukemische lymfoblasten van de lymfocyten van een gezonde identieke tweeling partner.

Of de stimulatie van lymfocyten door leukemische cellen in een zogenaamde M.L.C. wel het juiste middel is om leukemie antigenen aan te tonen wordt echter betwijfeld. Immers Green en Sell (1970) toonden aan, dat in vitro uit lymfocyten van gezonde personen lymfoblastoïde cellijnen konden ontstaan. Deze cellen bleken de eigen lymfocyten te stimuleren.

In een enigszins andere proefopstelling vonden Steel en Hardy (1970) hetzelfde: lymfocyten-cellijnen, afkomstig van patiënten met een mononucleosis bleken later in staat te zijn de lymfocyten van dezelfde, reeds lang



genezen, patiënt te kunnen stimuleren. Deze waarnemingen wijzen er dus op, dat lymfocyten van dezelfde donor kunnen prikkelen tot groei. Ook Schweitzer c.s. (1973) betwijfelen op grond van hun ervaringen of een positieve reactie van autologe lymfocyten op leukemische cellen inderdaad een antigeen verschil aantoonde.

Indien 'normale' lymfoblastoïde cellen dus autologe lymfocyten kunnen stimuleren, behoeven de waarnemingen van Mann c.s. (1971) en Halterman c.s. (1972) niet op specifieke antigenen van het Burkitt-lymfoma te wijzen. Beide groepen toonden aan, dat antisera tegen een gezuiverde celmembraan component uit een Burkitt-lymfoma cytotoxisch waren voor leukemische cellen van zowel lijders aan acute lymfoblastaire als acute myeloïde leukemie. De weefselkweek van Halterman zou bovendien zeker virusvrij zijn. In feite dragen dan prolifererende, al of niet leukemische, cellijnen bepaalde antigenen die mogelijk identiek zijn en niet leukemie- maar 'proliferatie'-specifiek zijn.

Fundamentele waarnemingen lijken mij de onderzoeken van Viza c.s. (1971) te zijn. Zij isoleerden een leukemie antigeen uit menselijke leukemische cellen, waartegen ze een antiserum bij het dier konden opwekken. Dit antiserum bleek ook met serum te reageren van een deel van de geteste patiënten, lijdende aan uiteenlopende ziekten: acute myeloïde en acute lymfoblastaire leukemie, chronische myeloïde en chronische lymfatische leukemie. Verder bleken zelfs positieve reacties op te treden met sera van sommige M. Hodgkin patiënten. Het belangrijkste is echter wel, dat ook het serum van embryo's dit antigeen bevatte, in tegenstelling tot het serum van gezonde mensen.

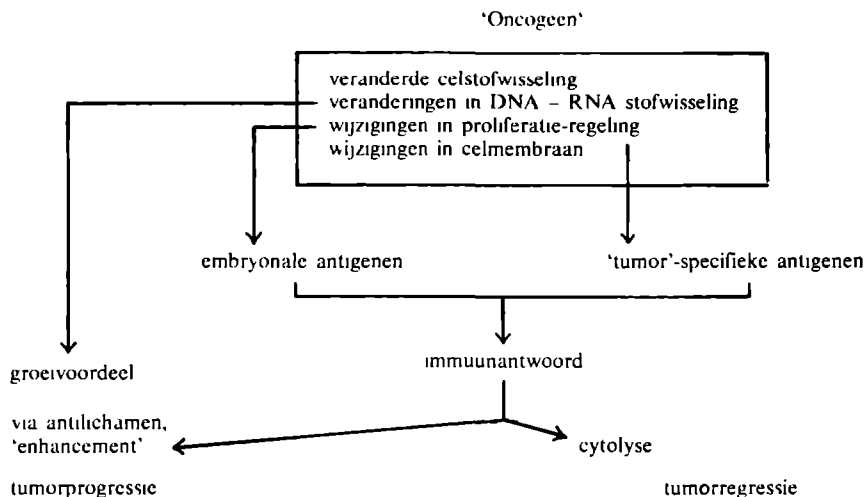
De vergelijking dringt zich dan ook op met het zogenaamde carcino-embryonale antigeen (C.E.A.) dat gevonden wordt bij het embryo en dat ook bij aandoeningen van volwassenen voorkomt die gepaard gaan met een abnormale of ongebreidelde groei van darmepitheel; (colitis ulcerosa, colon carcinoom, zie b.v. Lo Gerfo 1971.) Zowel bij maligne groei (Wallach 1969) als bij proliferatie van normale cellen onder invloed van mitogenen verandert het celoppervlak en mogelijk gebeurt dit zonder celvermeerdering ook onder invloed van virale infecties (Pegrum 1973). Hierbij komen mogelijk antigenen naar voren, die onder normale omstandigheden niet aanwezig c.q. verborgen zijn. Dit zou het dan aannemelijk kunnen maken, dat identieke leukemie-antigenen worden aangetroffen bij zowel de acute myeloïde leukemie, de acute lymfatische leukemie, als het Burkitt-lymfoma. Een verband met het Rauscher virus (Ioanides c.s. 1968, Bates c.s. 1969) is daarmee nog niet geheel verklaard.

De mogelijke konsekwenties en het belang van leukemie-, tumorspecifieke en embryonale antigenen wordt weergegeven in figuur I-1, overgenomen van Harris (1973). Een immunologisch antwoord kan leiden tot het uiteenvallen van de maligne cel ('cytolyse'); volgens Klein (1970) is hiervoor de celgebonden immuniteit van overheersend belang. Ook antilichamen, gevormd tegen de tumorspecifieke of tegen de embryonale antigenen, kunnen bijdragen tot deze cytolyse. Via een niet cytolytische binding aan deze celmembraan-antigenen kunnen zij echter evenzeer de cytolyse

door middel van de celgebonden immuniteit verhinderen. Indirect wordt hierdoor de groei bevorderd, omdat een effectieve cytolyse verhinderd wordt; dit fenomeen wordt genoemd: 'tumor-enhancement'. 'Tumor-protection' of een soortgelijke term zou echter beter voor dit verschijnsel geschikt zijn. Bij maligne groei kunnen de tumor- of leukemiecellen hun antigenen afstoten. Deze oplosbare antigenen kunnen zich binden aan cytotoxische cellen, waardoor deze cellen niet meer effectief zijn. Uit onderzoek is gebleken, dat sommige dierexperimentele sarcomen sneller groeien indien zij méér antigeen loslaten (Alexander 1974).

Tenslotte bestaat nog de mogelijkheid, dat er ondanks deze antigenen geen enkele vorm van immuun-antwoord optreedt. Dit kan dus te wijten zijn aan de enorme overmaat oplosbaar antigeen bij snelgroeïende maligne tumoren, maar uiteraard ook aan de cytostatische therapie. Voor dit laatste fenomeen, het ontbreken van een immuun-antwoord, worden de termen immuuntolerantie en immuunparalyse gebezigd. Voor verdere informatie over deze uiteenlopende mechanismen zij verwezen naar het overzichtsartikel van Bernstein (1973).

FIGUUR 1-1 (vrij naar Harris 1973)



#### 4.3. De relatie tussen het HL-A-systeem en acute leukemie

Ellman c.s. (1970) vermelden, dat bij muizen de kans op een oncogeen effect door het Gross- of Friend-virus verhoogd is, indien deze muizen een bepaald type transplantatie-antigeen op het oppervlak van hun lymfocyten hebben. Hierdoor zou het virus in antigene structuren overeenkomst vertonen met de gastheer en minder goed als 'vreemd' worden herkend; de eliminatie door immuunmechanismen verloopt dan trager of zou kunnen ontbreken.

Jeannet c.s. (1971) zagen geen enkele maal het HL-A 11 antigeen bij 34 patiënten met acute lymfatische leukemie, terwijl dit in de gehele bevolking bij 16% wel aanwezig is. Franse onderzoekers (Degos en Dausset 1972) echter konden o.a. bij patiënten met acute lymfatische leukemie geen specifiek patroon aantonen. Ook kinderen met acute lymfatische leukemie onderscheiden zich niet van een normale populatie in hun HL-A patroon (Lawler c.s. 1971, Batchelor c.s. 1971). Een andere moeilijkheid is, dat herhaling van deze HL-A typering niet steeds een identiek resultaat oplevert, indien deze op verschillende momenten wordt bepaald (Pegrum 1973). HL-A antigenen spelen waarschijnlijk wel een rol, c.q. bepaalde patronen zijn in hogere frekwentie aanwezig, bij ziekten waarbij de auto-immuunmechanismen van belang zijn (McDevitt en Bodmer 1974). Een verband tussen het HL-A systeem en de kans op acute leukemie lijkt bij de mens echter niet aanwezig te zijn. Tolerantie van een oncogeen agens op grond van identieke antigene structuren, zoals bij de muis wel mogelijk is, lijkt bij de mens dus niet te kunnen worden verklaard door overeenkomsten met bepaalde HL-A-antigenen.

#### *4.4. Preëxistente afwijkingen in de immuniteit en het ontstaan van acute leukemie*

Indien de eerder vermelde immunosurveillance hypothese van Burnet (1970) juist is, is te verwachten, dat bij kinderen met aangeboren tekortkomingen in de immuniteit zich o.a. leukemieën vaker zullen ontwikkelen. Op deze problematiek zal in het volgende hoofdstuk nader worden ingegaan. Opgemerkt moet worden dat ernstige immuundeficiëntie-ziekten zeldzaam tot zeer zeldzaam zijn; het percentage patiënten met een preëxistente immuundeficiëntie onder de groep van leukemie-patiënten is in feite zeer laag; op een totaal van 124 kinderen met een acute leukemie en 4 met een chronische myeloïde leukemie zagen wij slechts éénmaal een patiëntje met een uitgesproken immuundeficiëntie-syndroom, te weten een patiëntje met een ataxia teleangiectasia en een acute lymfoblastaire leukemie.

In hoeverre lichte en subtielere stoornissen in de immuniteit mede kansvergroterend werken is uiteraard zeer moeilijk vast te stellen. Uit de anamnese kan men een indruk krijgen over het verloop van infecties en vaccinaties vóór het manifest worden van de ziekte. De humorale immuniteit is enigszins te kwantificeren door bepalingen van immuunglobulinegehalten in het bloed en dergelijke, de cellulaire immuniteit laat zich moeilijker onderzoeken. In het volgende hoofdstuk zullen enkele facetten van de immuniteit besproken worden, mede gezien in het kader van de ontstaanswijze en de pathofysiologie van de acute leukemie. Onder andere omdat op kinderleeftijd acute lymfoblastaire leukemie het overheersende type is, zullen deze aspecten vooral besproken worden in hun mogelijke samenhang met dat speciale leukemietype.

#### *4.5. Samengaan van acute leukemie met andere afwijkingen en ziekten*

Bij de Wilms tumor worden betrekkelijk vaak afwijkingen gevonden zoals irisafwijkingen, hemihypertrofie van een ledemaat en dergelijke. De aard

van de relatie tussen deze uiteenlopende afwijkingen en de Wilms tumor is onduidelijk. Bij 124 kinderen met acute leukemie zagen wij de volgende afwijkingen samengaan, elk eenmaal: neurofibromatosis, syndroom van Marfan, ganglioneuroom, cystin-lysinurie, ataxia-telangiectasia en eenmaal een familiale dominant erfelijke vorm van thrombopenie. Of dit in alle gevallen alleen door het toeval verklaard mag worden is niet duidelijk. Het samengaan van neurofibromatose en het syndroom van Marfan is ook door anderen vermeld (Fraumeni 1969). Dat bij immuundeficiëntiesyndromen vaker een leukemie wordt gezien is wel bekend (Gatti en Good 1969, Kersey c.s. 1974).

Bij kinderen met een acute lymfoblastaire leukemie zou een bepaald dermatoglyfen-patroon significant veel vaker voorkomen. Uitbreiding en bevestiging van dergelijke onderzoeken zijn zeker gewenst (Wertelicki c.s. 1973). De aard van de onderlinge relatie is vooralsnog onduidelijk.

#### CONCLUSIE

Samenvattend kan men zich in 1975 nog wel verenigen met de definitie van leukemie opgesteld door de Gruchy in 1966. Het weglaten van een zinsnede omtrent de etiologie is nog steeds aanvaardbaar. Een duidelijke oorzaak is (nog) niet bekend. Wel lijkt het er op, dat wij enig inzicht hebben in die factoren, die de kans op het ontstaan van een leukemie verhogen. De zwaarte van milieufactoren en van zuiver genetische factoren is nog steeds onduidelijk.

De veronderstelling van Zuelzer en Cox (1969), dat de ontvankelijkheid om een acute leukemie te ontwikkelen polygeen is, dat wil zeggen afhankelijk is van een aantal zeer uiteenlopende factoren, lijkt aantrekkelijk. Het is een onopgelost probleem of van deze uiteenlopende factoren één factor, indien zeer groot, alleen tot een acute leukemie aanleiding kan geven, of dat er steeds een samengaan moet zijn van uiteenlopende factoren. Daarbij mag men de mogelijkheid niet uitsluiten, dat bij een groep individuen met een hoge 'ontvankelijkheid' dit slechts bij een deel van hen tot een manifeste leukemie leidt, terwijl ook bij individuen met een geringe 'ontvankelijkheid' deze ziekte zich kan ontwikkelen.

De acute leukemie bij de patiënt is het optreden van anders levende cellen in een overigens goed geordend organisme. De onvoorstelbare complexiteit hierbij maakt daarom uitspraken met een groot zekerheidsgehalte niet goed mogelijk. Voorlopig zullen wij ons ten aanzien van pathogenese en etiologie tevreden moeten stellen met aanwijzingen en vage inzichten.

## MOGELIJKE BETREKKINGEN TUSSEN IMMUNOLOGISCHE DYSFUNCTIE EN DE GENESE VAN DE ACUTE LEUKEMIE

### INLEIDING

In het voorgaande hoofdstuk werden reeds enkele immunologische en infectieuze factoren genoemd, die een rol kunnen spelen bij de ontstaanswijze en het niet spontaan teruggaan van de acute leukemie.

In dit hoofdstuk zullen enkele aspecten van de acute leukemie besproken worden vanuit de vraagstelling in hoeverre immunologische factoren een rol kunnen spelen bij de genese van de acute leukemie.

In het bijzonder zal daarbij ingegaan worden op de mogelijke genese van de acute lymfoblastaire leukemie van het kind. Deze ziekte neemt immers, zoals verderop zal worden aangetoond, een zeer bijzondere plaats in in het geheel van de acute leukemieën.

### 1. CONGENITAAL IMMUNDEFICIËNTIE EN IATROGENE IMMUNOSUPPRESSIE

Aandoeningen met uitgesproken stoornissen in de immunologische sfeer zijn bij kinderen zeer zeldzaam. In de meeste gevallen blijken deze dan nog te berusten op aangeboren, vaak erfelijk bepaalde deficienties van één of meer onderdelen, c.q. functies van het immunologische systeem. Kinderen, waarbij zeer ernstige tekortkomingen aanwezig zijn in de cellulaire afweer, overlijden vaak zeer vroeg, tenzij het lukt om door middel van beenmerg- en thymustransplantatie de ontbrekende cellen c.q. weefsels aan te vullen (bijvoorbeeld de Koning c.s. 1969).

Bij de minder levensbedreigende afwijkingen, die een betere prognose quod vitam hebben, omdat de tekortkomingen minder ernstig zijn, zoals de ataxia teleangiectasia, of waarbij substitutietherapie mogelijk is (bijvoorbeeld de agammaglobulinemie van Bruton), kunnen vaak waarnemingen gedaan worden die een verdieping geven van onze inzichten in de fysiologie van de immuniteit. Een van de opmerkelijke waarnemingen, bij de langer levende groep patienten met immunologische stoornissen, betreft de hoge frekwentie van voorkomen van maligne lymfoproliferatieve aandoeningen (Gatti en Good 1969, Kersey c.s. 1974). Bij deze kinderen ontstaan echter vooral maligne lymfomen. Hoewel acute leukemie zeker ook vaker voorkomt, wordt deze aandoening in vergelijking met het maligne lymfoom minder dikwijls waargenomen.

Deze maligne lymfoproliferatieve aandoeningen worden ook in veel hogere dan normale frekwentie gezien bij patienten die een niertransplantatie ondergingen. Hierbij wordt iatrogeen de immuniteit verstoord door cytostatica en corticosteroiden (zie bijv. Wegmann c.s. 1974). De verleiding bestaat dan om wat voorbarig te concluderen, dat deze therapie via

immuunsuppressie het ontstaan van een maligne lymfoproliferatieve ziekte luxceert. Dit moge juist zijn, maar enkele kanttekeningen zijn hierbij op hun plaats.

Deze transplantaties vinden veelal plaats nadat er een, vaak langdurige glomerulonefritis is geweest. De term chronische glomerulonefritis omvat echter een groep van uiteenlopende ziekten, waarbij immunologische mechanismen ten nadele van de patiënt hebben gefunctioneerd. Dankzij de transplantatie leven deze patiënten langer zodat het denkbaar is, dat een anderssoortige tweede 'vergissing' gemaakt kan worden, die eventueel mede wordt geluxceerd door de immuunsuppressief bedoelde therapie. Gershwin en Steinberg (1973) opperen de mogelijkheid, dat het transplantaat via continue prikkeling van de immunologische rejectie-mechanismen de oorzaak is van deze maligne proliferatieve aandoeningen. Bij mijn weten is echter een verhoogde incidentie van acute leukemie en met name de lymfoblastaire vorm daarvan, bij deze patiënten niet beschreven. In deze context moge ook opgemerkt worden, dat bij een andere groep patiënten, die óók jarenlang met cytostatica en corticosteroiden wordt behandeld, géén verhoogde frekwentie van maligne lymfomen en dergelijke wordt vermeld. Dit betreft namelijk de vele kinderen met een acute lymfoblastaire leukemie die vaak 2 tot 5 jaar, of zelfs langer hiermee behandeld werden of worden.

Uit het bovenstaande blijkt dus dat bij een, al of niet iatrogene, dysfunctie of deficiëntie van het immunologische apparaat niet zozeer een acute leukemie te verwachten is, maar wél de kans op het ontstaan van andere, meer tumoreuze, lymfoproliferatieve aandoeningen sterk is toegenomen.

## 2. INCIDENTIE, LEEFTIJD- EN GESLACHTSVERDELING VAN ACUTE LEUKEMIE EN LYMFOPROLIFERATIEVE AANDOENINGEN

De incidentie van deze groep ziekten is bij kinderen, adolescenten en jonge volwassenen veel geringer dan bij oudere personen. Een nadere analyse van de frekwentieverdeling is echter op zijn plaats; er blijken immers duidelijke verschillen te zijn in de afzonderlijke leeftijdsgroepen 0-5 jaar, 5-10 jaar, 10-15 jaar, die zeer uitgesproken zijn en waarvoor een sluitende verklaring ontbreekt.

### 2.1. Incidentie bij kinderen van de ziekte van Hodgkin en het non-Hodgkin maligne lymfoom

De M. Hodgkin komt in tegenstelling tot de acute leukemie bij kinderen jonger dan 6 jaar nauwelijks voor; vanaf deze leeftijd neemt de frekwentie geleidelijk toe; uit alle publicaties blijken verder duidelijk meer jongens dan meisjes aan deze ziekte te lijden. De histologie, de primaire localisatie, stagiëring bij de diagnose en de prognose is in de groep patiënten van 5 à 10 jaar tot 30 à 40 jaar in grote lijnen overeenkomstig (Smithers, 1970). Men kan dus stellen, dat de M. Hodgkin een ziekte is van overwegend jonge volwassenen, waaraan óók een aantal oudere volwassenen en kinderen kunnen lijden. De wijze waarop deze aandoening zich meestal manifesteert bij patiënten ouder dan 50-60 jaar is een geheel andere en wordt hier buiten beschouwing gelaten.

Deze incidentieverdeling blijkt ook terug te vinden in het eerder vermelde Amerikaanse onderzoek (Fraumeni 1969). Het zeer geleidelijk toenemen in frekwentie van voorkomen van de M. Hodgkin na het vijfde levensjaar bij kinderen is verder ook op te maken uit de Europese gegevens van o.a. Teillet (1968), Kurz (1972) en ook uit onze eigen ervaring.

Ten aanzien van het non-Hodgkin maligne lymfoom lijkt de incidentie op elke leeftijd van 3 tot 13 jaar even hoog te zijn. Jones c.s. (1973) hebben bericht over 405 patiënten, lijdende aan een non-Hodgkin maligne lymfoom. Bij het analyseren van hun publicatie krijgt men de indruk, dat in hun patiëntenmateriaal de groep 0-5 jarigen mogelijk ondervertegenwoordigd is. De aantallen patiënten in de leeftijdsgroepen 5-9, 10-14, 15-19 en 20-24 jaar waren echter ongeveer even groot. Jenkin (1973) bericht over zijn ervaringen bij 102 kinderen in Toronto, Canada, en de groep van Lemerle c.s. (1973) vermelden hun ervaringen met ruim 200 kinderen in Frankrijk. Uit beide publicaties blijkt, dat het maligne non-Hodgkin lymfoom gelijkmatig over de kinderleeftijd is verdeeld.

Uit hun gegevens en de Amerikaanse van Miller en Dalagar (1974) blijkt verder, dat deze aandoening bij jongens ongeveer 3 x vaker voorkomt dan bij meisjes. Uit de gegevens van Sullivan (1973) afkomstig uit Houston, Texas, is géén leeftijdsverdeling op te maken; wel lijkt het, dat er meer jongens dan meisjes lijdende aan de diverse typen van het maligne lymfoom werden geobserveerd.

## *2.2. De incidentie, leeftijds- en geslachtsverdeling van acute leukemie bij kinderen en jonge volwassenen*

De incidentieverdeling over de leeftijden van de acute leukemie bij personen van 0 tot 30 jaar à 35 jaar laat een geheel ander beeld zien dan bij de boven besproken lymfoproliferatieve aandoeningen. Een aantal, representatief te noemen, publicaties zullen hier nader worden besproken.

Enkele auteurs (Dameshek en Gunz 1954, Stewart 1972) gingen hierbij uit van de leeftijd van overlijden. Zij hebben de gegevens bewerkt uit een periode waarin een enigszins effectieve therapie niet bestond of nog niet algemeen werd toegepast. De leeftijd van overlijden zal dus bij het allergrootste deel van de patiënten hooguit enkele maanden hebben verschild met de leeftijd waarop de diagnose werd gesteld. Als men dus de leeftijd van overlijden als richtlijn gebruikt, neemt de incidentie van de acute leukemie af in de volgorde: 0-5 jaar, 5-10 jaar, 10-15 jaar; pas na het 25ste-30ste levensjaar treedt, aanvankelijk geleidelijk, weer een stijging op.

Vooraf bij kinderen is de laatste jaren de overleving steeds meer toegenomen; de auteur kent persoonlijk 8 kinderen met een overlevingsduur van 6-8 jaar die allen nog in leven zijn. Hierdoor wordt de waarde van statistieken, die gebaseerd zijn op de leeftijd van overlijden, geringer: er treedt een schijnbare verschuiving op naar de oudere leeftijdsgroepen en een aantal patiënten, die overleven, worden niet meer vermeld. Er bestaan echter ook verschillende publicaties (zie onder) waarin de leeftijd van het debuut van de ziekte als uitgangspunt werd genomen.

Daarbij kan een verdeling gemaakt worden in 3 groepen: 0-5 jaar, 5-10

TABE II-1 *Leeftijdsverdeling bij kinderen met acute leukemie*

leeftijd		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	totaal	
	type																		
1	Iversen (1966)	A I	24	42	73	81	53	42	39	18	22	14	17	14	31	23	23	-	516
2	Steinberg (1960)	A L	18	26	37	41	37	25	16	15	9	5	3	2	3	3	4	2	246
3	Nijmegen (1975)	A I	5	5	14	20	15	14	4	10	7	3	10	4	4	7	1	1	124
	A L L	4	4	12	16	13	14	4	8	6	2	9	3	3	4	1	1	104	
	A M L	1	1	2	4	2	-	-	2	1	1	1	1	1	3	-	-	20	
4	N W L K (1974)	A L L	6	10	19	23	22	19	9	5	7	2	9	4	5	5	3	-	148
	A M I	2	-	6	2	1	5	3	1	3	2	1	2	3	4	2	2	39	
5	Leukemia Trials Office (1974)	A M L	7	20	8	12	5	8	8	6	7	12	9	4	8	4	-	-	118

Verklaring

1 - retrospectief onderzoek in Denemarken 1946-1957

2 - klinische patienten, Boston, V S - 1959

3 - Universiteitskinderkliniek 11 1966 - 11 1975

4 = aangemelde patienten 15-3 1973 - 15-9-1974 N W L K, Den Haag

5 - persoonlijke mededeling Dr H E M Kay, Londen, Engeland



jaar, 10-15 jaar. Gezien de enorme biologische verschillen in deze leeftijds-groepen is het bij het bestuderen van de pathologie van het kind eigenlijk steeds nodig van dergelijke ondergroepen gebruik te maken, i.t.t. de pathologie van de volwassenen waar men in veel gevallen een groep van bijvoorbeeld 25-tot 50-jarigen als één geheel kan beschouwen. Ter illustratie van de incidentieverdeling over de leeftijd en bij het debuut van de acute leukemie bij het kind zullen nu enkele representatieve publicaties besproken worden. Het is hierbij geenszins de bedoeling om alle auteurs die hierover bericht hebben, te vermelden.

Browning en Gross (1968) hebben hun gegevens over het voorkomen van acute leukemie bij kinderen, door hen waargenomen in de jaren 1955 tot 1965, als volgt gerangschikt: 100 kinderen waren jonger dan 5 jaar, 42 kinderen waren 5-9 jaar en 26 waren 10-14 jaar bij het begin van de ziekte. Fernbach (1973) vermeldt de bevindingen van de Amerikaanse Southwest Cancer Chemotherapy Study Group over de jaren 1958-1971, bij in totaal 1024 kinderen met acute leukemie. De leeftijdsverdeling was als volgt: jonger dan 2 jaar: 14%; patiënten 2-5 jaar: 47%; patiënten 6-10 jaar: 24%; en ouder dan 11 jaar: 15%. De hoogste frekwentie bij deze onderzoeken uit de Verenigde Staten, ligt steeds in het 4de levensjaar.

Om een nadere indruk te geven van de exacte verdeling over de leeftijden worden in tabelvorm hieronder enkele Europese studies vermeld (tabel II-1).

Al deze gegevens samenvattend mag men concluderen:

1. ook bij kinderen jonger dan 3 jaar komt acute leukemie zeker voor
2. de hoogste frekwentie wordt gevonden in het 4de levensjaar
3. de incidentie neemt na het 5de levensjaar geleidelijk af, een tweede incidentie-piek lijkt te ontbreken.

In hoeverre rasverschillen van invloed zijn op de incidentie is misschien nog niet geheel duidelijk. In dit verband moet echter de studie van Miller en Dalager (1974) worden vermeld: daaruit blijkt dat in de Verenigde Staten de incidentieverdeling bij blanke kinderen niet verschilt met die in Europa. Bij de 'non-white' kinderen is èn de incidentie veel lager èn is deze gelijkmatiger over de kinderleeftijd verdeeld. Deze waarnemingen zijn dus niet geheel in overeenstemming met alle andere, hier vermelde gegevens. Ten aanzien van de geslachtsverdeling komt uit de meeste publicaties over de acute leukemie bij het kind vrij duidelijk naar voren, dat deze ziekte méér bij jongens dan bij meisjes voorkomt. De verhouding jongens - meisjes varieert van 1,5 : 1 tot 1,1 : 1. Terloops zij opnieuw opgemerkt, dat ook de M. Hodgkin en het non-Hodgkin maligne lymfoom op de kinderleeftijd bij méér jongens dan meisjes tot ontwikkeling komt. De oorzaak van deze merkwaardige geslachtsverdeling op een leeftijd dat hormonale verschillen nog zo gering zijn, is nog steeds niet afdoende verklaard.

### *2.3. Verschillen in incidentie en kliniek tussen de acute lymfoblastaire leukemie en andere vormen van acute leukemie bij kinderen*

Om deze verschillen aan te tonen is een eerste vereiste een zorgvuldig

hanteren van de differentiaal diagnostische criteria. In onze kliniek hebben wij voorheen de diagnose myeloblastaire leukemie nog al eens gesteld, die wij echter bij opnieuw doorkijken van de bewaarde preparaten, hebben moeten wijzigen in een lymfoblastaire leukemie. Dit is waarschijnlijk in Nederland een euvel geweest, dat over het gehele land was verspreid. Dit blijkt namelijk zeer duidelijk uit de recente publicaties van de Nederlandse Werkgroep Leukemie bij Kinderen (N.W.L.K.) (van der Does-van den Berg c.s. 1975). Uit de daarin vermelde gegevens over de landelijke enquête omtrent het voorkomen van acute leukemie in de jaren 1965-1972, is het zeker duidelijk dat de diagnose A.M.L. vaak gesteld is terwijl er sprake was van een A.L.L.

Uit het eigen onderzoek en de gegevens van de Nederlandse Werkgroep Leukemie bij Kinderen blijkt, dat bij kinderen de verhouding acute lymfoblastaire : acute niet-lymfoblastaire leukemie ongeveer 4 à 5 : 1 is. (zie tabel II-1).

Uit de Nederlandse gegevens blijkt niet, dat dit leukemietype op een bepaalde leeftijd frekwenter voorkomt. Ten aanzien van de geslachtsverdeling is op grond van de kleine aantallen geen oordeel mogelijk. Merkwaardig is wel, dat in de grote Engelse serie (zie tabel II-1) het aantal 1-3 jarigen zo hoog is.

Wat de behandelingsmogelijkheden van de acute myeloïde leukemie aangaat: ook bij het kind ondervindt men dezelfde moeilijkheden als bij volwassenen met dit leukemie-type: een gering percentage geslaagde remissies en hoge frekwentie van uitblijvende regeneratie van het beenmerg nadat dit celloos is geworden door de cytostatische therapie. Bij de drie patiënten met een meer monocyttaire vorm van leukemie zagen wij vrij langdurige remissies (1 à 2 jaar), bij de duidelijke myelocyttaire-promyelocyttaire vormen zijn de eigen ervaringen zeer teleurstellend.

De uitzichten op een volledige remissie, die bovendien wat langer duurt, zijn bij het kind misschien wel wat gunstiger dan bij volwassenen (Spiers 1972). Ons inziens zijn er echter geen wezenlijke verschillen tussen de myeloïde leukemie van het kind en die van de volwassene. Dit blijkt, behalve uit de eigen klinische ervaringen, ook uit onze waarnemingen van het in-vitro gedrag van leukemische cellen van acute myeloïde leukemie; met name is het celkinetische gedrag van leukemische cellen afkomstig van kinderen en die van oudere patiënten identiek (zie Hoofdstuk VI).

#### *2.4. De invloed van de leeftijd op de remissieduur*

Met vincristine en prednison, eventueel gecombineerd met rubidomycine (Mathé, 1967), komen volgens onze ervaringen vrijwel alle kinderen lijdende aan een acute lymfoblastaire leukemie in remissie. De remissieduur blijkt bij dit leukemie-type onder andere afhankelijk te zijn van de leeftijd, waarop de ziekte heeft gedebuteerd (Spiers 1972).

De A.L.L. komt bij patiënten ouder dan 30-35 jaar slechts uiterst zeldzaam voor, de meeste volwassenen zijn adolescenten of jonge volwassenen. Het verschil in prognose is dan des te opvallender te meer daar men mag aannemen, dat bij de groep van 15-30 jaar factoren als verminderde vitaliteit,

regeneratievermogen en dergelijke nog geen belangrijke rol zullen spelen. Indien de prognose bij jonge volwassenen inderdaad slechter zou blijken te zijn, zou men, afgezien van de onbekende invloeden door de hormonen van de geslachtsrijpe gonaden en dergelijke, zich ook kunnen afvragen of de genese van dit type leukemie dezelfde is als bij het jonge kind. Een andere 'verwerking' van de ziekte of eventuele verschillen in tolerantie en stofwisseling van de medicamenteuze therapie is ook niet uitgesloten. De vermelde gegevens van Bernard (1973) wijzen er echter wel op, dat ook bij volwassenen een zeer langdurige remissie zeer wel mogelijk is. Beard en Hamilton Fairley (1974) menen, dat het 'breekpunt' ten aanzien van een gunstige prognose 15 jaar is; oudere patiënten met een acute lymfoblastaire leukemie zouden een veel slechtere prognose hebben. Indirect volgt dit ook uit de gegevens van Bernard c.s. (1973); zij zagen 194 patiënten met dit leukemie-type waarvan de eerste remissie langer dan 4 jaar duurde. De verhouding kinderen : volwassenen was bij deze gunstige groep  $9 : 1$ , terwijl het uitgangsperscentage kinderen bij dit type leukemie-patiënten slechts 60% was. Het blijkt uit een zeer groot onderzoek, dat reeds onder de leeftijd van 15 jaar de prognose, althans wat de overlevingsduur betreft, bij kinderen na de leeftijd van 5-6 jaar slechter wordt (George c.s. 1973).

### 3. HET VERBAND TUSSEN INFECTIES EN DE ONTSTAANSWIJZE VAN DE ACUTE LEUKEMIE

De diagnose wordt vaak gesteld naar aanleiding van een acute infectie die niet vlot wil genezen. Gezien de dan vaak aanwezige leukopenie en/of neutropenie is dit geen verwonderlijke bevinding. In deze paragraaf zal nagegaan worden of er bij kinderen ook een oorzakelijke relatie zou kunnen bestaan tussen infecties en de genese van de acute leukemie, in het bijzonder van het lymfoblastaire type.

Fernbach (1973) merkt op, maar aanleiding van de piekincidentie rond het 3e en 4e levensjaar 'that the parallel relationship between the peakage of leukemia and that of common childhood infectious diseases stimulated much consideration that leukemia might be caused by an infectious agent'. Deze opmerking omtrent het samenvallen van de piekincidentie van de acute leukemie met een eventuele top in frekwentie van infectieziekten behoeft wel enige analyse en commentaar:

1. Er zijn vrij veel kinderen van 1 tot 3 jaar oud waarbij een acute leukemie ontstaat. Een deel van deze kinderen blijkt zeer vaak anamnestic eigenlijk nog nooit ziek te zijn geweest. Vaak betreft het eerste of enige kinderen met weinig of geen contacten met leeftijdsgenoten of kleuters.

2. Hoewel luchtweg- en darminfecties bij kinderen onder de 4 jaar zeker veel voorkomen, vinden in dit land veel infecties plaats na het 4de levensjaar. Op die leeftijd gaan kinderen immers naar de kleuterschool, een plaats, waar zij veel pathogene micro-organismen onderling uitwisselen.

3. Infecties bij kleuters verschillen in zoverre met infecties bij ouderen, dat hier procentueel veel meer primo-infecties bij zijn. Iedereen wordt immers qua immunologisch geheugen als een onbeschreven blad geboren.

en zal in de eerste levensjaren veel immunologische herinneringen moeten vastleggen. Bij geïsoleerd opgroeiende kinderen (dunbevolkte streken en plattelandsgebieden) worden mogelijk minder herinneringen vastgelegd in de eerste 4 -6 levensjaren.

Indien er toch een samenhang bestaat tussen infecties en de genese van de acute leukemie bij het kind is deze in de tijd zeer waarschijnlijk niet gelijktijdig. Boyer (1973) veronderstelt, dat bij het kind de acute leukemie een ongebruikelijke en zeer zeldzame verwikkeling is van een bijna altijd onopvallend verlopende infectieziekte.

Een uitgesproken tekortschieten of een onrijpheid van de immuniteit kan moeilijk hieraan ten grondslag liggen: immers reeds bij de geboorte is de rijping van het immunologisch apparaat reeds zeer ver gevorderd (Prindull 1974). Bovendien is de feitelijke incidentie van de acute leukemie bij zeer jonge kinderen toch ook zeer laag. Het is onwaarschijnlijk, dat de kleuters en schoolkinderen waarbij een acute leukemie ontstaat, als groep zich immunologisch vóór het begin van hun ziekte hebben onderscheiden van hun gezond blijvende leeftijdsgenoten (zie hoofdstuk III). De virale etiologie van leukemie is bij de mens weliswaar nog niet aangetoond, er zijn nochtans sterke aanwijzingen dat leukemische cellen contact gehad kunnen hebben met een onbekend virus (zie later). De suggestie van Boyer is dus wel niet bewezen, maar verdient zeker wel overweging.

Het is verder echter ook geenszins ondenkbaar, dat op een infectieus agens een reactie kan optreden, die pas enkele jaren later leidt tot een manifeste acute leukemie. De piekincidentie rond het 3e tot 5e levensjaar zou dan berusten op een ontsporing of een vergissing enkele jaren eerder.

#### 4. BESCHOUWINGEN OMTRENT DE GENESE VAN DE ACUTE LYMFBLASTAIRE LEUKEMIE

##### *4.1. Ontwikkeling van het specifieke geheugen en het specifieke immuun-antwoord*

Voor een overzicht van de ontwikkeling van het immunologisch apparaat tijdens de embryonale periode moge verwezen worden naar het overzichts-artikel van Prindull (1974). Reeds zeer vroeg in de ontwikkeling ontstaat de thymus, spoedig hierna wordt dit gevolgd door het optreden van lymfocyten, die al vroeg in de intra-uteriene fase immuno-competent blijken te zijn. Dit blijkt uit het reeds vroeg aantoonbare vermogen van deze lymfocyten om op fytohemagglutinine te reageren met groei en transformatie, zogenaamde T-lymfocyten rozetten te vormen en een passende partner te zijn in de zogenaamde gemengde lymfocytenkweek. De lymfocyten van de pasgeborenen met een T cel functie zijn kennelijk talrijk genoeg om te voorkomen dat thymectomie bij de neonatus tot dezelfde rampzalige uitval van de cellulaire immuniteit leidt zoals dat bij pasgeboren muizen wel het geval is.

Hoewel het kind de eerste maanden post partum ten dele nog leeft onder de bescherming van moederlijke antilichamen, is een eigen immuunglobulineproductie mogelijk. Het is een overbekend feit, dat in de intra-

uteriene periode het embryo zich minder goed kan verweren tegen pathogene kiemen; hierop wijst het feit, dat vele infecties een dodelijk verloop hebben en/of een geheel ander ziektepatroon laten zien. Nochtans moet men aannemen, dat zeker aan het einde van de zwangerschap, reeds een specifiek geheugen en een specifiek immuunantwoord mogelijk is. Dit blijkt immers uit de specificiteit van het prenataal gevormde immuunglobuline van het IgM type.

Het vermogen om immunologisch herinneringen vast te leggen is reeds zeer vroeg aanwezig, het vermogen om hierdoor op een eerste of een later contact met het immunogeen specifiek te antwoorden ontstaat eveneens reeds zeer vroeg. De macrofagen zijn niet verantwoordelijk voor de specificiteit van het immuunantwoord. Wel kunnen zij door het binden van RNA aan het immunogeen het immunogene vermogen hiervan versterken (Bach 1972). De specificiteit van het geheugen en of uiterste specificiteit van het antwoord veronderstelt een uiterst nauwkeurige reproduceerbare pasvorm tussen immunogeen en onder andere het immuunglobuline. Ehrlich gebruikte daarvoor de term: sleutel in het slot (geciteerd door Humphrey en White 1972).

Immuunglobulinen zijn eiwitten; de juiste code voor de bouw van eiwitten wordt bewaard in het kern DNA. Burnet (1970) heeft voor deze specificiteit zijn zogenaamde 'clonal selection theory' ontwikkeld: door derepressie van inactief DNA wordt een specifiek antwoord gegeven. Deze theorie houdt verder in, dat voor elk immunogeen, reeds voordat er enig contact is geweest, er daarvoor gevoelige lymfocyten aanwezig zijn.

Deze lymfocyten vormen samen de talloze clonen, elk immunogeen stimuleert in vivo zijn 'eigen' kloon. De celkern bevat zeker buitengewoon veel DNA en men kan zich voorstellen, dat er inderdaad voor zeer vele immunogenen in het DNA een daarvoor passend stukje aanwezig is.

Onopgelost blijft door deze hypothese van Burnet hoe het immunologische geheugen ontstaat. Gezien de feitelijke afname van het lymfoïde weefsel na de eerste 5-7 levensjaren is het niet denkbaar, dat dit geheugen bewaard blijft door toename in omvang c.q. celaantal van elke kloon. Bovendien wordt door deze theorie onvoldoende verklaard hoe het haarscherpe onderscheid gemaakt wordt tussen zelf en nietzelf; dit haarscherpe onderscheid is noodzakelijk om het leven te laten voortbestaan.

#### *4.2. Aard van de relatie tussen oncogene virussen en de al of niet maligne ontlaarde gastheercel*

Leukemische ziekten bij het dier blijken, zeker ten dele, te berusten op infecties met zogenaamde oncornavirussen. 'onco' slaat daarbij op onco-geen en 'rna' op het RNA, waarmee deze virussen hun genetisch materiaal meevoeren i.t.t. de zogenaamde DNA-virussen die dit in de vorm van DNA doen. Het is gebleken, dat deze oncogene virussen in staat zijn een DNA copie van hun eigen RNA in de kern van de gastheer te doen opnemen. Hierdoor wordt de gastheercel er toe gebracht om ook de daarbij behorende eiwitten te produceren ten gerieve van het virus. Het virus bezit

hiervoor een zogenaamd RNA afhankelijke DNA-polymerase, waardoor een geheel of gedeeltelijk DNA-genoom van het virus gevormd wordt. Het virus RNA dient daartoe dus als een matris voor de vorming van DNA, dat tenslotte in de gastheercelkern wordt opgenomen. De aanwezigheid van dit enzym, het RNA afhankelijke DNA-polymerase of 'reverse transcriptase' wordt wel beschouwd als een 'footprint left in the sand'. Het gehele virus behoeft dus niet meer aanwezig te zijn, maar de aanwezigheid van dit enzym wijst op een intracellulair verblijf in een al of niet recent verleden. Het daarbij opnieuw gevormde DNA is voor de celkern in feite nieuw genetisch materiaal, dat echter tot onevenwichtigheid van de celkern kan leiden. Ioniserende straling, virale infecties, verouderingsprocessen en dergelijke zouden dan eerder tot maligne proliferatie van dergelijke cellen aanleiding kunnen geven (Rainer c.s. 1974).

Het 'reverse transcriptase' is door verschillende onderzoekers aangetoond in humane leukemische cellen. Gallo c.s. (1970) vonden dit in lymfoblasten van acute lymfoblastaire leukemie patiënten, maar niet in de door lytohemagglutinine (PHA) getransformeerde lymfocyten, dit werd bevestigd door onder anderen Sarngadharan c.s. (1972). Laatstgenoemden vonden bovendien, dat het gevormde DNA ten dele hybridiseert met het Rauscher-leukemie-virus RNA, Rainer c.s. (1974) konden reverse transcriptase in alle vormen van humane leukemie aantonen.

Het is niet bewezen, dat normale, ongeïnfecteerde en 'onberoerde' cellen over een eigen reverse transcriptase beschikken. Wel is aangetoond, dat met synthetische RNA-oligonucleotiden een DNA copie gevormd kan worden door zowel fibroblasten als lymfocyten (Scolnick c.s. 1971, Permer c.s. 1971). Uit het bovenstaande volgt, dat een reverse transcriptase in de natuur voorkomt en dat er aanwijzingen zijn, dat in nooit geïnfecteerde cellen een soortgelijke enzymactiviteit niet uitgesloten is.

#### *4.3 De bijzondere plaats van de acute lymfoblasten leukemie onder de maligne aandoeningen*

De kans op het ontstaan van maligne aandoeningen neemt met het ouder worden steeds meer toe. Bij kinderen en jonge volwassenen is de incidentie van alle maligne aandoeningen tesamen uitermate gering. In deze leeftijdsgroep wordt maligne groei uitgaande van zeer gedifferentieerde cellen van de tractus digestivus, respiratorius of urogenitalis, vrijwel niet gezien. Ook maligne groei van zeer gedifferentieerde cellen, zoals de prolifererende cellen van het plasmacytoom komt, althans bij kinderen, niet of nauwelijks voor. De prolifererende cellen van het maligne lymfoblastaire lymfoom bij kinderen hebben vaak kenmerken van de rijpe T-lymfocyt en lijken een uitzondering te vormen op deze regel (Kaplan c.s. 1974).

Van de weinige maligne aandoeningen, die bovendien dikwijls een onrijp-cellig en pleomorf karakter hebben (Wilmstumor, rhabdomyosaroom, neuroblastoom enz.) wordt op de kinderleeftijd ongeveer de helft gevormd door de acute leukemie. Bovendien is bij kinderen 80-90% van het lymfoblastaire type, een type dat in steeds afnemende frekwentie tot het 20ste-30ste levensjaar, maar bij ouderen uiterst zeldzaam wordt gezien, on-

danks de sterk stijgende incidentie van de acute myeloïde leukemie na het 30ste levensjaar (Stewart 1972).

De merkwaardige incidentieverdeling over de leeftijden bij het kind en het zo sterk overwegen van juist dit type maligniteit bij het jonge kind, is nooit afdoende verklaard. Het ligt voor de hand om een verband te zoeken met bepaalde factor(en), die alleen bij het kind (nog) een grote rol kunnen spelen.

#### *4.4. De aard van de prolifererende cel bij de acute lymfoblastaire leukemie*

Het zoeken naar de aard van de prolifererende cel bij de acute lymfoblastaire leukemie is niet een louter academisch tijdverdrijf. De benamingen acute stamcel; acute blasten-, lymfo- of parblastenleukemie zijn namen zonder een voldoende wetenschappelijke basis. Op grond van de bevindingen van anderen en van ons, beschreven in hoofdstuk VI, wordt het steeds meer aannemelijk om te stellen dat bij de acute lymfoblastaire leukemie de prolifererende cel een min of meer uitgerijpte thymusafhankelijke lymfocyt (T-lymfocyt) is. De kenmerken van de bursaafhankelijke lymfocyten (B-lymfocyt) blijken steeds afwezig te zijn (zie hoofdstuk VI).

Een sterke aanwijzing voor het lymfoïde karakter van de prolifererende cellijn bij dit type leukemie vormen ook de ervaringen met corticosteroiden en L-asparaginase (de Vaan c.s. 1971). De twee middelen zijn eigenlijk alleen werkzaam bij dit type maligne aandoening en hebben geen of slechts gering effect op andere leukemie typen. Bij de mens zijn de rijpende lymfoïde cellen zeer gevoelig voor corticosteroiden; indien zij hun uitrijpingsfase in de thymus voltooid hebben zijn zij hiervoor niet of veel minder gevoelig (Craddock c.s. 1971). Ohno en Hersh (1972) toonden zeer fraai aan, dat L-asparaginase een zeer negatieve invloed heeft op (rijpe) lymfocyten.

Wanneer gesteld mag worden dat de prolifererende cel bij de acute lymfoblastaire leukemie dus een cel is die op weg is om een T-lymfocyt te worden, dient het verklaard te worden, waarom juist dit type leukemie in deze hoge frekwentie bij het, bijna steeds normale, kind voorkomt. Elders in dit proefschrift wordt immers getoond, dat kinderen met een acute leukemie niet worden gekenmerkt door een immunologische deficiëntie noch dat er een uitgesproken familiale, erfelijke, predispositie is. De kans voor het kind om deze ziekte te krijgen lijkt vrijwel geheel door het lot te worden bepaald (zie Hoofdstuk III).

#### 5. ACUTE LYMFOBLASTAIRE LEUKEMIE, RELATIES MET DE OPBOUW VAN HET IMMUNOLOGISCH GEHEUGEN EN EEN MOGELIJK VIRALE GENESE

Het aantonen van een virale genese bij dit leukemietype is (nog) niet overtuigend geslaagd. Een niet-virale genese van dit leukemietype is nog op een andere wijze verklaarbaar. Het jonge kind moet noodgedwongen in de eerste levensjaren zeer veel immunologische herinneringen vastleggen. Mogelijk wordt vrij regelmatig reeds intra-uterien hiermee begonnen. Het is geenszins ondenkbaar, dat bij dit proces, al of niet mede door

oncogene virussen, vergissingen of fouten gemaakt kunnen worden. Het is verder niet ondenkbaar, dat dergelijke processen in onuitgerijpte, qua immunocompetentie nog 'uncommitted', cellen plaats vinden en dat bij deze onrijpe cellen de kans op vergissingen extra groot is. In Hoofdstuk VI wordt het waarschijnlijk gemaakt dat de maligne cellijn bij de A L L een 'prolymfocytair' aard heeft. De kans, dat een acute lymfoblastaire leukemie bij een kind ontstaat is dan 'at random' op elk vast aantal 'inprentingen' zal een bepaald aantal fouten gemaakt worden. Het vrijwel geheel ontbreken van een erfelijke predispositie voor deze ziekte past goed in deze gedachtengang, evenals het in wezen normaal zijn van de humorale en cellulaire immuniteit bij kinderen met een acute lymfoblastaire leukemie. In een reeds afwijkende celkern (trisomie 21, andere chromosomale afwijkingen) is het denkbaar, dat dit eerder tot ontsporingen aanleiding zal geven.

De hoge frekwentie van de acute leukemie bij kinderen met een trisomie 21 syndroom wordt dan begrijpelijker.

Samengevat verklaart deze theorie dus

- 1 de onbegrepen hoge incidentie van juist de acute lymfoblastaire leukemie bij het zeer jonge kind en het schoolkind, die geheel in tegenstelling is tot de incidentie van vele andere maligne aandoeningen bij mensen van 0-30 jaar

- 2 het fenomeen dat bij de acute lymfoblastaire leukemie eigenlijk steeds gezien wordt indien men met een intensieve therapie in korte tijd het beenmerg vrijwel blastenloos en celloos maakt, kan men, althans bij kinderen, rustig de regeneratie afwachten, die vrijwel zeker komt bij acute lymfoblastaire leukemie, maar zowel bij kinderen als bij volwassenen lijdende aan een A M L, zo vaak uitblijft. Niet alle stamcellen van het beenmerg zijn aangetast: er is 'slechts' een overwoekering van leukemische cellen, die ontstaan uit reeds ten dele gedifferentieerde cellen en niet rechtstreeks uit 'stamcellen'.

- 3 Het in wezen normaal zijn van de humorale en ook de cellulaire immuniteit, zoals in Hoofdstuk III op grond van de literatuur en de eigen ervaringen zal worden aangetoond.

#### CONCLUSIE

In dit hoofdstuk is vrij uitvoerig ingegaan op eigenlijk welbekende feiten, met name de incidentie en de feitelijke relatie tussen manifeste infectie en leukemie.

In het kader van het bovenbeschrevene lijkt het zinvol bijvoorbeeld de volgende vragen te stellen:

welke gegevens bestaan er omtrent een verband tussen de acute lymfoblastaire leukemie van het kind en gebeurtenissen in preconceptuele geschiedenis en graviditeit van de moeder, die de kans op een 'verkeerde' inprenting verhogen?

zijn er aanwijzingen in de voorgeschiedenis van kinderen, lijdende aan een acute lymfoblastaire leukemie, dat infecties bij hen anders zijn verlopen?



de 'inprenting' kan verkeerd zijn gegaan in de rijpingsfase van het immunologische apparaat of op een later tijdstip. Zou vergelijking van de groep van kinderen, waarbij de ziekte zeer vroeg debuteert, met de oudere groep patiënten verschillen opleveren?

De bovenbeschreven theorie sluit ideeën als immunosurveillance, immunotherapeutische mogelijkheden en dergelijke niet uit. In het volgende hoofdstuk zullen literatuurgegevens en de eigen klinische waarnemingen worden besproken, mede in het perspectief van de hierboven vermelde veronderstellingen.

## IMMUNOLOGISCHE/INFECTIEUZE FACTOREN IN DE LEVENSLIOP VAN KINDEREN MET ACUTE LEUKEMIE.

### INLEIDING

In hoeverre een immunologische dysfunctie een rol speelt bij de genese van de acute leukemie en het niet spontaan genezen is grotendeels onbekend. Vanuit de gedachte, dat immunologische en infectieuze factoren een rol kunnen spelen bij de genese van de acute leukemie, zal in dit hoofdstuk een geïntegreerd overzicht worden gegeven van literatuurgegevens en de eigen klinische ervaringen. Daarbij zal de aandacht geconcentreerd worden op de acute lymfoblastaire leukemie (A.L.L.) van het kind.

Omdat bij ziekten van jonge kinderen het altijd zinvol is om ook aan de moederlijke factoren aandacht te schenken, zullen deze vrij uitvoerig besproken worden. Te meer ook, omdat in het vorige hoofdstuk reeds geopperd werd dat de genese van juist de A.L.L. op ontsporingen of 'vergissingen' in de intra-uteriene fase kan berusten, is aandacht voor deze facetten hier op zijn plaats. In dit hoofdstuk wordt onder levensloop verstaan de periode liggend tussen de bevruchting van de eicel en het tijdstip waarop de diagnose acute leukemie werd gesteld.

Hoewel het (nog) niet bewezen is dat 'immunosurveillance' werkelijk bestaat, is toetsing van dit begrip aan de feitelijke gegevens toch nuttig te achten. In dat verband zullen die facetten besproken worden, die al of niet wijzen op (lichte) stoornissen in de immuniteit bij die kinderen, waarbij een acute leukemie zich manifesteert.

### I. MOEDERLIJKE FACTOREN IN DE GENESE VAN DE ACUTE LEUKEMIE BIJ KINDEREN

#### *1.1. Preconceptuele en zwangerschapsanamnese*

Voor de kinderarts vormt het opnemen van de zwangerschaps- en partus-anamnese een belangrijk onderdeel van de anamnese. Voor sommige ziekten kunnen hierdoor zeer sterke argumenten voor een bepaalde diagnose worden gevonden. Men denke bijvoorbeeld aan de zeer hoge frekwentie van stuitgeboorten bij kinderen met hypofysaire dwerggroei, de geringe intra-uteriene kindsbewegingen bij het Prader-Willi syndroom enz. In de gangbare pediatrie handboeken wordt over het verloop van de graviditeit van kinderen lijdende aan een leukemie, weinig of niets vermeld.

Ouders van kinderen vragen zich steeds af wat de oorzaak van de ziekte van hun kind is; noch hun zoeken, noch het speurwerk van vele medici hebben in dit opzicht duidelijke aanknopingspunten opgeleverd. Desondanks zijn er toch aanwijzingen, dat de moederlijke voorgeschiedenis vóór de conceptie en tijdens de graviditeit een rol speelt in de pathogenese en

zelfs in het verloop van de leukemie bij het kind. Zo hebben onlangs Gibson en Graham (1974) een relatie aannemelijk gemaakt tussen de kans op een langdurige remissie van de A.L.L. en de preconceptuele en zwangerschapsanamnese. Deze onderzoekers stelden vast, dat de kans op een langdurige remissie kleiner werd bij de aanwezigheid van onder andere de volgende factoren: virale infecties bij de moeder in de 5 jaar vóór de geboorte van de patiënt, ioniserende straling tijdens de zwangerschap, wanneer de patiënt het derde of volgende kind van de moeder was, en wanneer de moeder haar eerste kind op oudere leeftijd kreeg. Afgezien van de resultaten van toekomstige onderzoeken, wijzen hun resultaten er toch op, dat de preconceptuele en zwangerschapsanamnese van groot belang kan zijn.

### 1.2. Rangorde in het gezin

Voor een aantal ziekten en afwijkingen bij kinderen speelt de rangorde een grote rol: zo is bijvoorbeeld bij eerstgeborenen de kans op een moeilijke partus groter, voor latergeborenen is een toename in ernst van een eventueel aanwezig rhesusantagonisme bekend en voor de 'zeer laat' geborene is de kans, dat dit een trisomie-21 patiënt is, zéér groot.

TABEL III-1 Rangorde in het gezin van kinderen, lijdende aan A.L., vergeleken met frequenties van rangorde in de bevolking (Iversen 1966, Denemarken)

Rangorde in het gezin	A.L. patiënten aantal	%	bevolking Denemarken %
1	145	35	36
2	130	31	28
3	73	17	16
4	37	9	9
5	13	3,1	4,5
>6	16	3,9	6,5
	414	99%	100%

TABEL III-2 Rangorde in het gezin en leeftijd waarop diagnose A.L. werd gesteld (Iversen 1966, Denemarken)

Rangorde in het gezin	0-4 jaar		5-9 jaar		10-14 jaar		0-14 jaar aantal
	aantal	%	aantal	%	aantal	%	
1	78	54	48	33	19	13	145
>2	155	58	67	25	47	17	269
totaal	233	56	115	28	66	16	414

Men krijgt vaak de indruk, dat bij kinderen lijdende aan een acute leukemie het aantal eerstgeborenen en enige kinderen uitzonderlijk hoog is. Van de 101 kinderen, lijdende aan een acute lymfoblastaire leukemie, waarvan wij de rangorde weten, zijn er 45 eerstgeborenen, hiervan zijn er 18 bovendien enige kinderen. (tabel III-4). Indien dit werkelijk het geval zou zijn, ligt het voor de hand om een verband met de graviditeit aan te nemen. Indien het aantal enige kinderen zeer hoog zou zijn, is een relatie

TABLI III-3 *Verdeling van A L L-patienten naar rangorde en gezinsgrootte (Steinberg 1960)*

Gezinsgrootte	Aantal waarnemingen	Rangorde in het gezin													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	24	24													
2	74	39	35												
3	73	18	22	33											
4	34	5	14	6	9										
5	22	2	6	5	6	3									
6	14		1	2	4	3	4								
7	5			1		2		2							
8	1						1								
9	-														
10	-										1				
20	1													1	
	249	88	78	47	19	8	5	2			1			1	

N B alleen kinderen met acute leukemie, ongeacht subtypering

TABLI III-5 *Vergelijking leeftijdsverdeling eerstgeborenen met leeftijdsverdeling van alle A L L-patienten*

leeftijd	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15 jr	totaal
1e kind	3	3	5	9	3	8	2	3	2	-	3	1	-	2	-	1	45
allen	4	4	12	16	13	14	4	8	6	2	9	3	3	3	1	1	103

met een mogelijk verminderde vruchtbaarheid of ziekten van de ouders niet onmogelijk. Ten aanzien van dit laatste probleem bedenke men echter dat de acute leukemie juist zeer vaak bij jonge kinderen van 1-3 jaar oud optreedt uit gezinnen waar de volgende kinderen nog niet zijn geboren.

TABEL III-4 *Verdeling van A.L.L. patiënten naar rangorde en gezinsgrootte (eigen waarnemingen)*

gezinsgrootte	aantal waarnemingen	rangorde in het gezin											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	
1	18	18											
2	33	19	14										
3	19	5	4	10									
4	12	2	3	3	4								
5	3				1	2							
6	5	1		1	1	1	1						
7	4			1		1	1	1					
8	2								1				
9	2						1			1			
10	1										1		
11	1									1			
14	1											1	
totaal	101	45	21	15	6	4	3	2	1	2	1	1	

NB Rangorde onbekend: 1 x adoptie kind, 1 x kind uit tehuis, 1 x niet vermeld

Noch uit de gegevens van Iversen (1966) (tabellen III-1 en 2), noch uit die van Steinberg (1960) (tabel III-3) blijkt er een werkelijke 'overmaat' aan eerstgeborenen en/of enige kinderen te bestaan.

Beide auteurs ontkennen, dat er een relatie bestaat tussen de leeftijd van de moeder ten tijde van de graviditeit en de kans op het ontstaan van een acute leukemie bij het kind. Ter vergelijking met Steinberg (1960) worden in de tabel III-4 de gegevens verstrekt van de relatie tussen rangorde en gezinsgrootte bij kinderen lijdende aan A.L.L., door ons gezien in de Nijmeegse universiteitskinderkliniek. Bij 3 andere kinderen waren deze gegevens niet aanwezig. Bij de 20 kinderen lijdende aan een acute myeloïde leukemie (A.M.L.) waren rangorde en gezinsgrootte als volgt: 2 x 1/1; 4 x 1/2; 2 x 1/3; 1 x 1/4; 1 x 1/5; 4 x 2/2; 3 x 3/3; 2 x 4/4; en 1 x 8/8. Het aantal eerstgeborenen was bij dit leukemietype dus de helft. In tabel III-5 hebben wij uitgezet de leeftijdsverdeling van de eerstgeborenen tegen die van alle kinderen met A.L.L. door ons gezien. Hoewel beide reeksen getallen klein zijn, lijken ze niet zeer uiteen te lopen.

Ons patiëntenmateriaal bestrijkt een periode van 9 jaar. In deze periode zijn er grote veranderingen opgetreden in de gezinsgrootte, bovendien is het aantal patiënten uit kleinere plaatsen relatief groot. Statistische bewerking van deze cijfers lijkt daarom weinig zinvol. Het ware wenselijk een landelijk prospectief onderzoek te doen gedurende enkele jaren, zodat de gegevens van Steinberg (1960) en Iversen (1966) nog eens getoetst werden aan Nederlandse bevindingen. Voorlopig lijkt de conclusie zeker nog ge-

wettigd, dat de rangorde waarschijnlijk geen duidelijke invloed heeft op de kans dat het kind een acute leukemie ontwikkelt.

### *1.3. Miskramen bij de moeder*

Gibson c.s. (1968) noemen 'reproductive wastage' bij de moeders als een van de factoren, die in geringe mate kansverhogend zou werken. De oorzaken van miskramen zijn uiteraard legio en indien er een verband zou bestaan met de kans op leukemie bij het kind, lijkt dat dan toch slechts voor een deel van de oorzaken op te gaan. Om een indruk te geven over de frekwentie waarin dit gegeven in de anamnese positief was, werden retrospectief de ziektegeschiedenissen hierop doorgenomen.

Bij 98 kinderen lijdende aan een A.L.L. kon van de moeder zelf de anamnese worden afgenomen. Het is de vraag of bij alle moeders voldoende zorgvuldig navraag is gedaan en of de antwoorden steeds correct zijn vastgelegd.

Dé laatste 4-6 jaren is zeker wel steeds aandacht aan dit onderdeel van de anamnese besteed. Bij 5 moeders bleek dat vóór de geboorte van de patiënt er 3 x één en 2 x twee miskramen waren geweest. Bij 4 moeders was de graviditeit volgend op de geboorte van de A.L.L. patiënt geëindigd in een abortus, een van deze moeders had echter ook een diabetes mellitus. De 20 moeders van kinderen, lijdende aan de andere vormen van acute leukemie, hadden anamnesticus géén miskramen gehad.

Al deze getallen zijn onvoldoende om een eventuele invloed aan te tonen. Het ware ook hieraangaande aan te bevelen om centraal toch meer van dergelijke anamnesticus gegevens te verzamelen.

Omdat slechts een deel van de abortus-oorzaken (infectie?) mogelijk kansvergroterend zou werken, ware het aan te bevelen tevens prospectieve onderzoeken te beginnen. Ons inziens hebben de eigen gegevens slechts de waarde van een indruk van de omvang deze problematiek en niets meer.

### *2.1. Infecties zonder aanwijsbare oorzaak*

Bij sommige onderzoeken (Sutton c.s. 1969, Chandra 1972) is het niet goed mogelijk om scherp af te bakenen of de vermelde onderzoekresultaten wijzen op een intra-uteriene infectie of een gezins-infectie na de geboorte van de patiënt. Enkele hiervan zullen nu in het kort worden besproken.

Naar aanleiding van het onderzoek van Butler (1973) moet hier nog zijn opmerking vermeld worden, dat de toename van influenza in 1958-1959 slechts gepaard ging met een zeer geringe toename van de sterfte aan leukemie bij kinderen jonger dan 5 jaar in deze jaren. Leck c.s. (1973) menen, dat de door hen beschreven tijdelijke stijging in incidentie van leukemie bij het kind te wijten zou zijn aan een locale pandemie (van welke infectie?). Hun waarnemingen (zie tabel III-8) zijn door anderen (Falk c.s. 1973) niet bevestigd. Leck c.s. vermelden bovendien niet de schommelingen in incidentie per jaar tussen 1954-1970, zodat voorzichtigheid geboden blijft bij de interpretatie.

TABE! III-6 *Maligne aandoeningen met een positieve anamnese t a v influenza in de graviditeit 1959 kinderen (Butler 1973)*

ziekte	influenza in grav week	debuut ziekte bij het kind in jaren
A L I	18	2
Wilms tumor	18	onbekend
A L L	12	6
A L L	36	9
A L L	23	10
A L L	28	9
M Hodgkin	30	6
A L L	32	onbekend

Totaal 8 oncologische ziekten waarvan 6 keer A L L bij 1959 kinderen

TABE! III 7 *Maligne aandoeningen met ontbreken van een influenza infectie in de zwangerschap bij 14 791 kinderen (Butler 1973)*

Ziekte	Aantal	debuut van de ziekte bij het kind
Wilms tumor	3	2 x onbekend, 1 x 4 mnd
medulloblastoom	2	onbekend
lymfosarcoom	1	1 jaar
A L L + trisomie 21	1	1 jaar
A L I	3	2, 6 en 10 jaar
A M L	1	6 jaar
neuroblastoom	1	10 jaar

Totaal 12 oncologische ziekten waarvan 4 keer A L L bij 14 791 kinderen

TABE! III 8 *Leck c s (1973) Incidentieverdeling van acute leukemie in Manchester Engeland*

Leeftijd	tijdvak	absoluut aantal	incidentie per 10 <sup>6</sup> persoonsj
0- 4 jaar	1954-1970	274	45.2
	1971-1972	50	66.8
5-14 jaar	1954-1970	252	22.3
	1971-1972	36	24.4

Sutton c s (1969) vonden in Engeland, dat bij de 45 door hen onderzochte moeders van A L L patiënten, de IgM spiegels in het bloed significant hoger waren dan bij een controle groep moeders. De broertjes en zusjes (sibs) van de patientjes lijdende aan een A L L bleken gemiddeld een lagere IgA spiegel te hebben in vergelijking met een controle groep kinderen afkomstig uit gezinnen zonder A L L patienten. Bij een soortgelijk onderzoek verricht in India door Chandra (1972) bleken de bevindingen anders te zijn: bij 29 moeders van een kind lijdende aan A L L was het IgG gehalte gemiddeld 40% en het IgM gemiddeld 35% hoger dan bij een even grote groep controle moeders. Bij de 42 sibs was het IgG gehalte sig-

nificant lager ongeveer 35%, terwijl het IgA en IgM gehalte bij deze sibs gelijk was aan dat van een controle groep. Interessant is ook zijn waarneming, dat in het navelstrengbloed van het eerste kind, geboren uit de moeder na de patient met A L L, het IgM gehalte duidelijk was verhoogd bij de 6 zuigelingen, waarbij dit kon worden nagegaan. Het aantal waarnemingen is natuurlijk laag, bovendien is niet aangegeven het tijdsverschil tussen de geboortedata van het zieke kind en het daarop volgende en evenmin tussen debuut van de ziekte en de geboorte van het volgende kind.

Evans (1973) ging de immuunstatus na van bloedverwanten van kinderen lijdende aan een A L L. 33 moeders, 17 vaders en 14 'sibs'. De conclusie lijkt volgens hem gewettigd, dat er bij deze bloedverwanten geen wezenlijke stoornis in de immuniteit bestaat. Het gemiddelde IgA en IgM gehalte was bij de moeders van patienten toch resp. 10 en 20% hoger dan bij de controles. Opvallend was bovendien, dat deze moeders en de enkele onderzochte vaders een statistisch significant hoger lymfocyten aantal hadden dan de controle ouders. De resultaten van bovengenoemde onderzoeken zijn dus wel zeer uiteenlopend, maar lijken toch wel aanwijzingen op te leveren voor een mogelijk verband tussen het optreden van acute leukemie bij een kind en een infectie van de moeder tijdens of na de graviditeit. Helaas wordt door geen enkele onderzoeker, uitgezonderd Gibson *et al.* (1968) de leeftijd vermeld waarop de acute leukemie bij de patienten debuteerde. Vergelijkingen tussen de bevindingen bij moeders en sibs van kinderen waar de ziekte in de eerste 5 jaar heeft gedebutteerd en van kinderen waar de ziekte later is ontstaan zouden misschien interessante uitkomsten kunnen leveren.

## 2.2 *Verband met het Epstein-Barr virus en acute leukemie*

Het Epstein-Barr virus (E B V) staat zeker in relatie met het Afrikaanse Burkitt-lymfoom en het Zuidchinese nasofaryngeale carcinoom (Langenhuis *et al.* 1973, Miller 1974). Dit virus hoort tot de groep van de herpes virussen en is haast wel zeker identiek met de verwekker van de ziekte van Pfeiffer *et al.* de mononucleosis infectiosa. Een bijzondere eigenschap van dit virus is het vermogen om daarmee geïnfecteerde lymfocyten *in vitro* tot een in de tijd onbeperkte groei te kunnen brengen.

Dit virus heeft ongetwijfeld een relatie met de bovengenoemde maligne aandoeningen, het is mogelijk om in de celkernen het complementaire DNA genoom van dit virus aan te tonen. Ditzelfde complementaire genoom blijkt echter niet aantoonbaar bij diverse vormen van leukemie (Miller 1974).

Intra-uteriene infecties met dit virus lijken slechts zeer zelden voor te komen, Joncas *et al.* (1974) konden dit bij een groep van 112 normale pasgeborenen in geen enkel geval aantonen. Wel toonden deze onderzoekers aan, dat deze pasgeborenen E B V-antilichamen konden hebben via de moeder. Dit laatste bleek uit de spontane daling van de titers in de eerste levensweken. Zeer veel kinderen blijken reeds in de eerste drie levensjaren een seroconversie te vertonen, gemiddeld 10% per jaar bij de door Joncas



c.s. (1974) onderzochte groep kinderen. Bij het merendeel van de jonge volwassenen blijkt uit de aanwezigheid van antistoffen tegen het E.B.V., dat deze een contact met dit virus hebben gehad (Langenhuysen en The 1973, Miller 1974). Indien dit virus een oncogene werking heeft, komt dit dus slechts zeer zelden tot uiting. Bovendien dient opgemerkt te worden dat bij de maligne woekeringen van het lymfoïde systeem, waarbij het E.B.V. is betrokken, de prolifererende celsoort uitgesproken eigenschappen heeft van de bursa-afhankelijke lymfocyt of B-lymfocyt (zie Pattengale c.s. 1974). Voor de genese van de A.L.L., die in ieder geval geen B-lymfocytenaandoening lijkt te zijn (zie Hoofdstuk VI), lijkt dit virus ook daarom geen rol te spelen bij de etiologie van de A.L.L.

Op grond van serologische onderzoeken menen Miller c.s. (1972) dat er geen verschillen zijn tussen patiënten lijdende aan A.L.L. en gezonde leeftijdsgenoten. De hieronder geciteerde onderzoekers menen wel, dat het serologisch onderzoek bij patiënten en naaste bloedverwanten niet identiek is met dat van een controle groep. Zo vonden Zorbala-Malios c.s. (1975) zeer vaak antilichamen van het IgM type, gericht tegen het viruscapside en het oplosbare complement bindende antigeen van het E.B.V., nl. bij 12 van de 16 onderzochte moeders en bij 3 van de 4 onderzochte sibs van kinderen, lijdende aan een A.L.L. Dergelijke antilichamen ontbraken bij 12 gezonde controle vrouwen. Reeds eerder had dezelfde groep onderzoekers (Sutton c.s. 1974) gevonden, dat antilichamen gericht tegen dit oplosbare complement bindende antigeen bij kinderen, lijdende aan een A.L.L. en onderzocht binnen een maand na het stellen van de diagnose zeer vaak aanwezig was: bij 9 van de 10 patiëntjes i.t.t. 16 van de 31 onderzochte controles.

Naar aanleiding van deze bespreking van de betrekkingen tussen het E.B.V. en acute leukemie vermelden wij hier onze gegevens omtrent de aanwezigheid van heterofiele antilichamen, gericht tegen het mononucleosis virus, bepaald bij 49 kinderen ten tijde van het stellen van de diagnose A.L.L. Bij deze 49 kinderen werd vóór het begin van de therapie gezocht naar deze antistoffen. Bij 45 patiënten waren alle reacties (zonder absorptie, na absorptie met cavianiercellen en rundererythrocyten) negatief. Viermaal was alleen de reactie zonder absorptie positief: 2 x titer 1/20 en 2 x titer 1/80. Slechts éénmaal trad tijdens de eerste remissie inductie poging een duidelijke titerstijging op. Afgezien van de onderlinge samenhang en verwantschap tussen het E.B.V. en de mononucleosis infectiosa wijzen deze gegevens niet op een belangrijke rol van de ziekte van Pfeiffer bij de genese c.q. de luxatie van de A.L.L.

In hoeverre een infectie met dit virus, indien verlopend onder het beeld van een mononucleosis, het verloop van de acute leukemie beïnvloedt, is onduidelijk (Langhuysen 1974).

### 3. STOORNISSEN IN DE IMMUNITEIT BIJ KINDEREN LIJDENDE AAN ACUTE LEUKEMIE

Uiteraard moeten in dit kader alléén die facetten beschouwd worden, die vóór de ziekte aanwijzingen kunnen geven of vóór het begin van de thera-

pie bepaalbaar zijn. De therapie, de overwoekering door de maligne cellen, de achteruitgang van de algemene toestand vormen immers factoren, die min of meer ongunstig de specifieke immuniteit beïnvloeden.

Ten aanzien van de immuunstatus bij de naaste bloedverwanten blijkt uit het onder 2.1. vermelde onderzoek van Evans (1973), dat deze bij ouders en sibs normaal moet worden geacht.

### *3.1. Anamnestiche gegevens vóór het tijdstip van de diagnose*

Dat de diagnose acute leukemie bij kinderen vaak wordt gesteld naar aanleiding van een infectie, hoeft hier niet nog eens uitgewerkt te worden. Fernbach (1973) geeft op, dat dit bij 61% van alle kinderen het geval is. Wij menen echter, dat slechts bij  $\pm 1/3$  van onze patiënten dit het geval was. De vraag is, of er in de levensloop van het kind aanwijzingen zijn, dat contacten met immunogenen c.q. infecties anders zijn verlopen dan bij gezond gebleven kinderen. Vanuit die vraagstelling zullen de eigen ervaringen hieronder in het kort worden beschreven.

a. het verloop van vaccinaties:  
vrijwel alle kinderen hadden de pokkenvaccinatie en de DKTP-vaccinaties doorgemaakt. Zowel bij de A.L.L. als bij de A.M.L. patiënten waren deze ingrepen steeds geheel normaal verlopen. Vier van de vijf zuigelingen waren echter (nog) niet tegen pokken gevaccineerd. Bij een zuigeling werd kort na de geslaagde pokkenenting de diagnose A.L.L. gesteld. Drie kinderen hadden, wegens een verblijf in de tropen, verder nog een reeks andere vaccinaties doorgemaakt. Bij twee andere kinderen was B.C.G. vaccinatie voorheen geschied en deze was normaal verlopen. Gezien het grote aantal waarnemingen lijkt derhalve de conclusie gewettigd, dat althans het verloop van deze vaccinaties géén aanwijzingen hebben opgeleverd, wijzend op een immunologische insufficiëntie.

b. het verloop van de gewone kinderziekten:  
mazelen, een ziekte die toch wel erg ziekmakend kan zijn, was bij de 50 patiënten die dit vóór de diagnose A.L.L. doorgemaakt hadden steeds normaal verlopen. Hetzelfde geldt voor de waterpokken; bij de 32 kinderen, waarvan dit anamnestic bekend was, had de ziekte een onopvallend verloop gehad (tabel III-9 en 10).

c. K.N.O.- en luchtweginfecties:  
hoewel deze bij kinderen zeer veel voorkomen, zijn deze uiteraard moeilijk te kwantificeren; wat door sommige artsen als pneumonie wordt aangeduid, wordt door andere artsen als een lichte bronchitis aangemerkt, en omgekeerd. Om toch enig idee te hebben over de ernst van K.N.O.- en luchtweginfecties worden in tabel III-11 de frekwenties opgegeven waarop vóór het stellen van de diagnose A.L.L. tonsillectomie werd verricht. Terloops zij opgemerkt, dat de diagnose nog al eens (3 maal) werd gesteld naar aanleiding van een nabloeding van zo'n ingreep. Eveneens werd door verschillende K.N.O.-artsen deze ingreep uitgesteld

TABE! III-9 *Anamnesticch voorkomen van mazelen voor het begin van A L L*

[illegible]

TABEL III-10 Anamnesticch voorkomen van waterpokken voor het begin van de A I L.

[illegible]

TABLE III-11 *Tonsillectomie voor het begin van A L L*

[illegible]

(4 maal), omdat zij naar aanleiding van opvallende anemie, bloedingen of sterke lymfkliervergrotingen eerst de kinderarts of de internist hadden geconsulteerd. Opgemerkt moet worden, dat bij deze twee categorieën patiënten bij verder navragen de anamnese van recidiverende angina's bijna steeds vrij kort, 2-3 maanden was.

Hoewel onze gegevens (tabel III-10) slechts beperkt in omvang zijn, heeft de auteur niet de indruk, dat deze ingreep bij kinderen met acute leukemie bepaald vaker plaats heeft gevonden dan bij normale kinderen. Ook in dit opzicht zijn er geen aanwijzingen voor een tekortschieten van de immuniteit bij kinderen waarbij een acute leukemie ontstaat. Bij geen enkel kind jonger dan 2 jaar was een adenotonsillectomie verricht.

d. Frekwentie van andere gangbare infecties van de kinderleeftijd:

Vooraf bij de kinderen jonger dan 3 jaar was het zeer opvallend, dat vele van hen eigenlijk nooit eerder een dag ziek waren geweest voordat verschijnselen van de leukemie waren opgetreden. Regelmatig is het voorgekomen, dat de diagnose gesteld moest worden bij een kind uit een gezin van 3-7 kinderen waarbij de huisarts dit kind noch zijn/haar broers en zusters wegens een infectie ooit had gezien. Omdat deze gegevens moeilijk in tabelvorm zijn te brengen wordt volstaan met deze mededeling.

3.2. *Gegevens omtrent de humorale immuniteit ten tijde van het ziekte begin:*

Hierover zijn in de literatuur verschillende mededelingen terug te vinden. Een van de oudere onderzoeken betreft de verdeling van de serumglobulines bepaald met behulp van papierelectroforese (Fahey en Boggs 1960). Zij voerden bij 82 patiënten met A.L.L. en 28 patiënten met A.M.L. respectievelijk 171 en 64 maal een bepaling uit van een totaal serumeiwitgehalte en een eiwit electroforese.

Bij de A.L.L. patiënten bleken er statistisch geen verschillen aantoonbaar te zijn tussen de groep 5- tot 15-jarigen en de groep oudere patiënten. Zowel bij A.L.L. als A.M.L. was het albuminegehalte gemiddeld lager dan bij de gezonde controles. Het  $\alpha_2$ -globuline was bij de A.L.L. patiënten wat verhoogd, bij de A.M.L. patiënten werd een verlaagd  $\alpha_2$ - en  $\beta$ -globuline gevonden. Het  $\gamma$ -globulinegehalte was bij de A.L.L. als groep gemiddeld 10% lager, maar bij de A.M.L. patiënten vaak verhoogd.

Deze resultaten hebben betrekking op het gemiddelde van een grote serie onderzoeken bij normale personen en bij een grote groep patiënten.

In beide groepen, zowel patiënten als controles, was de normale spreiding vrij groot, zodat aan het electroforese beeld van de individuele patiënt geen enkele diagnostische waarde mag worden gehecht.

Ten aanzien van de serumimmuunglobulinegehalten bij het begin van de ziekte zijn verschillende meer recente publicaties beschikbaar. Mc. Kelvey en Carbone (1965) bepaalden de serum Ig gehalten bij 7 patiënten vóór het begin van de therapie: van de afzonderlijke immuunglobulines bleken de spiegels van IgG, IgA en IgM steeds in het gemiddelde  $\pm 1$  S.D. te vallen. Een normaal IgG gehalte vóór het begin van de therapie werd verder ook gevonden door Kiran en Gross (1969) bij 7 kinderen met A.L.L.

Freund en Hitzig (1969) menen, dat bij hun 19 kinderen met A.L.L. vóór het begin van de therapie de drie immuunglobulineklassen (IgG, IgA en IgM) een veel grotere spreiding vertonen dan bij een groep controle kinderen. Deze grote spreiding werd ook waargenomen door Ragab c.s. (1970) bij 12 kinderen met een onbehandelde A.L.L. Bij hun controle groep van gezonde kinderen bleek echter, dat de spreiding óók zeer groot was. Dit is ook wel te verwachten: immers kinderen met A.L.L. zijn voor een zéér groot deel jonger dan 5-6 jaar, een leeftijdsgroep waarop van nature de spreiding van de normaal waarden al zeer hoog is. Een recente publicatie betreffende de immuunglobulinenspiegels op het moment dat de diagnose acute leukemie werd gesteld, is van de groep van Zuelzer (Khalifa c.s. 1974). Zij onderzochten 83 kinderen lijdende aan A.L.L. en 37 kinderen, lijdende aan A.M.L. Bij beide groepen was de spreiding vrij groot; ze vonden echter, dat bij de A.L.L. de spiegels van de 3 hoofdklassen (IgG, IgA, IgM) vaak laag waren, ondanks het feit dat deze kinderen vaak recent infecties hadden doorgemaakt. Daarentegen waren in de groep A.M.L. patiënten de spiegels normaal of vaak zelfs hoog.

In de jaren 1973-1974 konden wij zelf bij 30 kinderen (26 A.L.L. en 4 A.M.L.) de Ig-spiegels en het haptoglobine en de  $\alpha_1$  antitrypsine kwantitatief bepalen vóór het beginnen van de initiële therapie. Opvallend is de zeer grote spreiding in de spiegels van haptoglobine en  $\alpha_1$  antitrypsine, twee eiwitten die respectievelijk met hemolyse en met acute infecties samenhangen (tabel III-12). Ons inziens is bij deze reeks waarnemingen niet te zeggen dat de Ig-spiegels sterk afwijken van de norm. Eén meisje (22) had langdurig een koortsende ziekte waarvoor geen infectieus agens werd gevonden, vóórdat de diagnose A.L.L. werd gesteld, bij haar was de IgG-spiegel excessief hoog.

Concluderend lijkt het nodig om te zien of bij een even grote groep patiënten als die, onderzocht door Khalifa c.s. (1974) in Nederland de bevindingen anders of gelijk zullen zijn dan hun resultaten.

### 3.2.1. Antilichaamvorming na infecties en vaccinaties

Dit laat zich slecht onderzoeken, omdat al spoedig met therapie begonnen moet worden. Bij één patiënt zagen wij een zeer hoge titerstijging tegen het monocucleosis virus tijdens een, niet geslaagde, remissie-inductie poging. Andere toevallige waarnemingen werden door ons niet gedaan. De A.L. leidt enerzijds tot een tekort aan effectorcellen en een verstoring van de histologie van lymfatisch weefsel, anderzijds zal de tegelijk gegeven therapie suppressief kunnen werken.

Dupuy c.s. (1971) vonden derhalve dan ook een verminderde antilichaamtiterstijging tijdens de remissie-inductie therapie. De bevinding van Dupuy c.s. (1971), dat de antilichaamvorming tijdens de remissie-inductie fase verminderd kan zijn, kan door tijdelijke verstoringen verklaard worden.

### 3.3. Cellulaire immuniteit

Indien men hieronder wil verstaan de functies van de thymusafhankelijke

TABLE III-12 *Gehalten aan immunoglobulinen, haptoglobine en  $\alpha_1$ -antitrypsine vóór behandeling A L*

Patient	M/V	leeftijd	haptoglobine mg <sup>o</sup> <sub>o</sub>	$\alpha_1$ -antitrypsine mg <sup>o</sup> <sub>o</sub>	IgG mg <sup>o</sup> <sub>o</sub>	IgA mg <sup>o</sup> <sub>o</sub>	IgM mg <sup>o</sup> <sub>o</sub>
<i>A L L</i>							
1	V	0,4	18	70	629	33	40
2	M	0,7	228	340	455	66	64
3	V	0,7	129	312	303	27	50
4	M	1,9	420	248	1150	165	128
5	V	2,0	16	982	759	34	64
6	V	2,9	400	40	651	39	114
7	V	2,11	275	250	998	87	219
8	V	3,0	368	270	1080	78	118
9	V	3,0	220	232	1302	39	81
10	V	3,4	180	398	629	135	145
11	M	3,6	330	370	1150	139	104
12	V	3,9	570	52	1649	272	226
13	V	3,11	173	90	781	204	145
14	M	4,6	155	345	1262	176	211
15	M	4,7	728	675	781	61	158
16	M	5,7	352	500	716	91	70
17	M	5,7	368	270	787	75	76
18	V	6,2	390	256	1120	42	114
19	M	7,3	150	272	1019	56	84
20	M	9,9	18	96	1302	91	138
21	V	10,1	246	64	781	56	76
22	V	10,2	158	330	2670	159	185
23	V	11,2	528	595	1420	127	111
24	M	13,5	73	44	629	113	209
25	M	14,11	160	252	954	87	74
26	M	15	1080	106	1236	135	131
<i>A M L</i>							
1	V	4,2	336	75	802	143	182
2	V	7,0	10	176	1085	148	189
3	V	12,8	476	360	1519	305	395
4	M	13,11	94	270	1497	431	155

normaal waarden: haptoglobine 100-300 mg<sup>o</sup><sub>o</sub>  
 $\alpha_1$ -antitrypsine 200-400 mg<sup>o</sup><sub>o</sub>

lymfocyten, zijn een groot aantal zeer uiteenlopende functies min of meer nauwkeurig bepaalbaar. In het perifere bloed is echter zeer vaak een enorme toename van leukemische cellen. Volmaakte scheidingstechnieken ontbreken echter, zodat een betrouwbaar onderzoek van de functie en de eigenschappen van de nog aanwezige bloedlymfocyten niet goed uitvoerbaar is.

### 3.3.1. Huidreacties

Enkele onderzoekers hebben de reactie nagegaan op intracutane toediening van antigenen. Dupuy c.s. (1971) gebruikten 4 verschillende antigenen. Het percentage positieve huidreacties was in de groep A.L. patiën-

ten even groot als in de controle groep. Tijdens de remissie-inductie bleken de reacties negatief te worden indien er een beenmergapanasie bestond. Vóór het begin van de therapie waren de positieve reacties bij de patiënten wél kleiner dan bij de controles, echter bestond er geen verband met het aantal leucocyten in het bloed. De reactie op huidtesten gevonden bij 25 A.M.L. patiënten door Hersh c.s. (1971) bevestigen dit onderzoek: in het algemeen waren de reacties wel even vaak positief maar de intensiteit was geringer.

Ook Santos c.s. (1973) vonden, dat patiënten met A.L.L. in de floride fase van de ziekte minder vaak positieve huidreacties vertoonden op antigenen, zoals bof, candida en tuberculine. De gegevens van Greene c.s. (1974) wijzen op een vermindering van de huidreacties bij onbehandelde niet-lymfoblastaire A.L. Het is dus niet onmogelijk, dat bij de A.M.L. wél een stoornis in de cellulaire immuniteit bestaat, maar dit is nog niet geheel bewezen.

Het gebruiken van huidtesten bij kinderen met A.L.L. is echter niet steeds zinvol; vaak betreft het immers zeer jonge kinderen, die vaak nog geen contact hebben gehad met bijvoorbeeld bof of tuberculose. Zelfs op candida reageren vele jonge kinderen nog niet. Bovendien is het aflezen van de huidreactie zeer vaak onmogelijk, omdat in de acute fase van de ziekte hierin zeer vaak bloedinkjes zullen optreden (Dupuy c.s. 1971). Een verder bezwaar tegen deze methodiek is, dat voor een normale reactie zowel lymfocyten, granulocyten als monoccyten nodig zijn. In feite is het dus een zeer grove test. Als kwantitatieve methode om de cellulaire immuniteit van de individuele patiënt na te gaan heeft het daarom ons inziens nauwelijks enige waarde.

### 3.3.2. Lymfocyten-functie-bepalingen in vitro

Andere methodieken zoals de stimulatie van lymfocyten met phytohemagglutinine (PHA) en andere mitogenen zijn onder andere gebruikt door Gutterman c.s. (1973). Het is niet geheel duidelijk in welk stadium van de ziekte zij de reactie van bloedlymfocyten op PHA en streptolysine nagingen. Bij hun patiënten met A.M.L. was de stimuleerbaarheid voor deze twee mitogenen voor de gehele groep patiënten niet afwijkend vergeleken met een groep controlepersonen. Bovendien is niet goed op te maken in hoeverre de stimuleerbaarheid van normale lymfocyten met of zonder leukemische cellen werd nagegaan. Deze problematiek speelt uiteraard ook een grote rol bij de A.L.L.; slechts in een minderheid bevat het bloed weinig of geen leukemische cellen bij het begin van de ziekte. Omdat lymfoblasten ook, ten dele, T-lymfocyt-functies en kenmerken hebben (zie hoofdstuk VI), is het dus slechts bij een deel van de patiënten mogelijk om de cellulaire immuniteit door een in vitro onderzoek van bloedlymfocyten na te gaan.

### 3.3.3. Immunologisch geheugen

In hoeverre dit gedragen wordt door T-lymfocyten of door T- en B-lymfocyten tesamen, valt buiten het bestek van het hier te behandelen onder-

werp. Er zijn een aantal gegevens waaruit blijkt, dat dit althans grosso modo intact blijft ondanks het optreden van een acute leukemie.

De argumenten hiervoor zijn de volgende:

a. hernieuwde expositie tijdens de ziekte aan het mazelen of waterpokken virus gaf nooit opnieuw het beeld van een eerste infectie te zien; er gebeurde eenvoudig niets.

b. in vitro blijken de lymfocyten ook na een geslaagde remissie-inductie nog steeds te reageren op specifieke mitogenen, i.c. tetanus en difterie (zie Hoofdstuk V).

c. het vaak positief blijven van huidreacties op antigenen (zie 3.3.1.).

Het negatief uitvallen is vaak te wijten aan een tijdelijk tekort aan andere cellen (monocyten, granulocyten), die bij deze reacties zijn betrokken.

#### CONCLUSIE:

De gegevens in dit hoofdstuk besproken wijzen er op, dat vroege contacten met immunogenen met name in de intra-uteriene fase een A.L.L. kunnen luxeren. Dit blijkt uit het geciteerde onderzoek van Butler (1973). Deze waarnemingen dienen echter herhaald en bevestigd te worden; gerichte prospectieve onderzoeken zijn helaas (nog) slechts sporadisch verricht. Het ware echter zeker wenselijk te achten om dergelijke onderzoeken te entameren.

Een intra-uteriene en een postnatale leukemogenese zou kunnen leiden tot verschillen in geslachtsverdeling, sociale herkomst, rangorde in het gezin, prognose en dergelijke tussen de jongere groep patiënten (0-6 jaar bijvoorbeeld) en de oudere groep. In de literatuur worden deze groepen nauwelijks afzonderlijk beschouwd. Het verschil in prognose wijst al op een zeker verschillend verloop van deze ziekte; nadere analyse ware wenselijk. Ons inziens is wel in voldoende mate aangetoond, dat immunologische tekorten, aangeboren of verworven, niet een belangrijk etiologisch moment kunnen vormen in de genese van de A.L.L. van het kind.

Noch het verloop van infecties, lang vóór de ziekte, noch de immunologische onderzoeken ten tijde van de diagnose hebben aanwijzingen opgeleverd voor een eventueel defect. Gezien het grote aantal patiënten, dat door anderen en door ons werd bestudeerd, is het bestaan van zeer subtiele stoornissen bij deze kinderen zeer onwaarschijnlijk te achten.

Zimmer c.s. (1975) vonden, dat bij A.L.L. patiënten en hun ouders er een tekort aan adenosine deaminase bestaat. Ons inziens dient een dergelijk onderzoek verder bevestigd te worden; indien werkelijk een erfelijke enzym deficiëntie aan de A.L.L. ten grondslag zou liggen, zou deze ziekte veel méér een familiair karakter hebben. Indien 'immuno-surveillance' werkelijk bestaat, heeft dat onderdeel van de immuniteit echter wel tekort geschoten.

Hoewel infecties zeer vaak de aanleiding vormen voor een medisch onderzoek waarbij de diagnose wordt gesteld, is een direct oorzakelijk verband tussen manifeste infecties en leukemie onwaarschijnlijk. Bij de myeloïde leukemie van het kind lijken evenmin immunologische factoren een rol te spelen in de genese.



Het bovenstaande is geenszins in strijd met de opvattingen, vermeld in hoofdstuk II, maar past zelfs zeer goed in de gedachtengang, dat het ontstaan van A L I samenhangt met een toevallige vergissing bij het opbouwen van het immunologische geheugen. Dat zo'n vergissing frekwenter is bij primaire stoornissen in de immuniteit ligt voor de hand en is niet in strijd met onze hypothese over de mogelijke genese van de A L L.

# DE TOEPASSING VAN CYTOSTATICA EN CORTICOSTEROIDEN BIJ DE ACUTE LEUKEMIE EN HAAR RELATIE TOT INFECTIES, IN HET BIJZONDER TOT WATERPOKKEN

## INLEIDING

In Hoofdstuk III werd een eventueel verband tussen immuniteit en de etiologie van de acute leukemie, met name de lymfoblastaire vorm, beschreven. In dit hoofdstuk zal aan de hand van een klinisch voorbeeld de relatie tussen antileukemische therapie en immuniteit worden nagegaan. De antileukemische therapie heeft in het algemeen gesproken geen positieve invloed op de afweer tegen infecties. Het is gebleken, dat het uitermate moeilijk is om hierover goede kwantitatieve gegevens te verkrijgen. De onderzoeksmethoden ter meting van de immuniteit zijn bewerkelijk en de normale spreiding van vele parameters is erg groot (zie Hoofdstuk V).

Bij deze problematiek spelen vele en uiteenlopende factoren een rol:

1. In hoeverre gaat de ziekte, waarvoor de therapie wordt gegeven, zelf gepaard met een tekort schieten van immunologische mechanismen? In hoofdstuk III werd aangetoond, dat, althans bij de acute lymfoblastaire leukemie, de immuniteit niet gestoord is.
2. In welke mate zijn de verschillende factoren van de immuniteit bij de afweer tegen uiteenlopende infecties betrokken: antilichamen, celgebonden specifieke immuniteit, fagocytose enz. Echter: het is niet waarschijnlijk, dat het immuunantwoord op hetzelfde immunogeen bij iedere persoon kwalitatief en kwantitatief identiek is (zie Hoofdstuk V).
3. De aard van de infecties: bacteriële infecties van ernstiger aard komen volgens onze ervaring eigenlijk vooral voor bij ernstige neutropenieën. Protozoaire infecties, zoals met pneumocystis carinii, blijken in de praktijk vaak moeilijk met zekerheid te diagnostiseren. Van virale infecties is niet goed bekend in hoeverre het gebruikte cytostaticum, naast zijn invloed op normale en maligne cellen, een virostatisch of viricide effect heeft. (cytosine-arabinoside, jood-desoxy-uridine).
4. In hoeverre wordt een bepaalde celsoort geremd in zijn activiteit of verminderd in aantal, levensduur of prolifererend vermogen? Lymfocyten, granulocyten en monocyt-macrofagen hebben een zeer uiteenlopende functie en stofwisseling en zijn mogelijk daarom zeer verschillend gevoelig voor cytostatica.
5. Betreft het een infectie met een min of meer gebruikelijke bewoner van huid, slijmvliezen of darminhoud of is het een infectie met een in nor-

male omstandigheden reeds pathogeen agens? Is het een primo-infectie of een her-infectie?

Deze lijst kan wellicht nog worden uitgebreid en het is duidelijk, dat bij de individuele patiënt deze problematiek slechts zeer ten dele te analyseren is.

#### I. WATERPOKKEN EN ACUTE LEUKEMIE

De kans op een primo-infectie met het varicella-herpes zoster virus is bij kinderen met acute leukemie zeer groot. Een groot deel hiervan heeft immers nog geen contact gehad met dit virus op het tijdstip dat bij hen de diagnose acute leukemie wordt gesteld.

Een primo-infectie verloopt onder het beeld van de waterpokken, een ziekte, die gemakkelijk herkenbaar is en waarvan het verloop bij normale kinderen vrijwel steeds goedaardig is. De algemene toestand wordt weinig beïnvloed en de ziekteduur is vrij kort. Complicaties zoals hemorrhagische varicella, pneumonie, encefalitis, orchitis en nefritis zijn zeer zeldzaam. Zo vermeldt bijvoorbeeld Brugsch (1963), dat er tussen 1894 en 1952 slechts 52 waarnemingen zijn vermeld van een hemorrhagische varicella, waarbij 18 maal de afloop dodelijk was. Schaison c.s. (1971) halen in verband met de goedaardigheid van het gebruikelijke verloop van de waterpokken het aforisme aan van Trousseau (1877): 'aucun médecin n'a jamais vu un malade mourir de varicelle'.

Van de varicella is bekend, dat deze onder antileukemische therapie ernstiger kan verlopen (zie bijvoorbeeld Schaison c.s. 1971). In Hoofdstuk III werd waarschijnlijk gemaakt, dat kinderen lijdende aan een acute leukemie géén intrinsieke stoornissen hebben in de immuniteit. Men mag daarom aannemen, dat bij kinderen lijdende aan een acute leukemie het eventueel ernstiger verloop te wijten is aan de antileukemische therapie. De beschrijving van de primo-infectie met het varicella-herpes zoster virus lijkt daarom een ideaal voorbeeld te zijn van wat de immuunsuppressieve werking van de therapie klinisch betekent, om de volgende redenen:

1. het betreft een primo-infectie waarbij i.t.t. een herinfectie een individueel zeer wisselende pre-existente immuniteit ontbreekt.
2. het normale beloop is bekend en is vrijwel steeds gunstig.
3. als primo-infectie wordt het vrijwel alleen gezien bij kinderen, zodat factoren als verminderde vitaliteit, individueel wisselende veroudering en dergelijke niet meespelen.

Tenslotte is deze infectie juist bij kinderen van groot praktisch belang en zijn er nog vele vragen ten aanzien van de therapie bij de ernstig verlopen gevallen.

#### 2. DE INVLOED VAN DE ANTILEUKEMISCHE THERAPIE OP HET VERLOOP VAN VARICELLA

Met name bij de acute lymfoblastaire leukemie spelen, naast cytostatica, corticosteroiden bij de therapie een grote rol. Het is nodig de invloed van deze laatstgenoemden afzonderlijk te bespreken.

### *2.1. De invloed van corticosteroiden:*

Sinds de invoering van ACTH, cortison en derivaten is herhaaldelijk beschreven, dat de waterpokkeninfectie optredend tijdens deze therapie, een dodelijke afloop kan hebben. Haggerty en Eley (1956) konden door middel van een enquête tien fataal verlopende gevallen bij kinderen opsporen. Cortison werd gegeven in een wisselende dosis: 25-400 mg d.d., gedurende enkele dagen tot meer dan 2 maanden. Slechts eenmaal betrof het een kind met een acute leukemie. Bernheim et al (1956) beschrijven twee kinderen waarbij wegens een acuut rheuma cortison werd toegediend. Tijdens deze therapie ontstond een hemorrhagische fataal verlopende waterpokken. Falliers en Ellis (1965) beschrijven hun ervaringen bij 21 kinderen die waterpokken kregen, terwijl zij wegens astma corticosteroiden kregen toegediend. De therapie was wisselend: 2,5-15 mg prednison d.d. of betamethason 0,3-1,8 mg d.d. Bij één kind ontwikkelde zich een pneumonie. Zij zagen geen enkele maal een dodelijke afloop. Deze auteurs verrichtten bovendien een uitgebreid literatuuronderzoek. In de publicaties van 1958-1963 werd over 253 kinderen gerapporteerd, die onder corticosteroiden-therapie een waterpokken infectie doormaakten. Uit hun overzicht was niet op te maken wat de beste handelswijze had moeten zijn ten aanzien van de corticosteroid-therapie: handhaven, de dosis verlagen, verhogen of staken.

Voor een adequate opvang van acute infecties is een verhoging van de endogene cortisolproductie soms noodzakelijk. De waarnemingen van Precyasombat (1965) en Aceto c.s. (1969) wijzen er op, dat een wezenlijke toename van de cortisol dagproductie bij het normale kind tijdens de acute fase van de waterpokken niet voorkomt. In hoeverre echter, bij de duidelijk ernstig verlopende beelden, de endogene productie verhoogd wordt, is niet vermeld in de literatuur.

Als na de incubatieperiode van een virale infectie de ziekte uitbreekt, komt in het algemeen de antilichaamproductie zeer snel op gang. Corticosteroiden in een hoge dosis toegediend, bijvoorbeeld als prednison 40 mg/m<sup>2</sup> lichaamsoppervlakte dd., zouden zeer wel het op gang komen van deze antilichaamproductie kunnen belemmeren. Nauwkeurige gegevens zijn hierover bij de mens niet bekend. Wel wijzen Schaison c.s. (1971) er op, dat de kans op een fataal verloop groter is als de ziekte uitbreekt tijdens of vlak na het beëindigen van een 'consolidatiekuur' met vincristine en/of rubidomycine gecombineerd met prednison.

Costicosteroiden beïnvloeden bij zoogdieren zeker het lymfoïde systeem, de uitkomsten van een aantal waarnemingen bij bijvoorbeeld knaagdieren zijn echter niet zonder meer op de mens van toepassing. Ten aanzien van de afweer door lymfocyten zal deze therapie echter ook bij de mens een negatief effect kunnen hebben. In Hoofdstuk V zal hierop nader worden ingegaan.

### *2.2. De invloed van cytostatica, eventueel tesamen met corticosteroiden*

Er bestaan verschillende publicaties over fataal verlopende waterpokkeninfecties bij kinderen, die wegens acute leukemie cytostatische therapie

ontvingen. Uiteraard was bij een groot deel van deze kinderen deze therapie, tegelijk of kort ervoor gecombineerd geweest met corticosteroiden. Ten aanzien van de exacte betrekkingen tussen aard en dosis van deze therapie en het verloop, is echter vrij weinig gepubliceerd. Zo beschrijft Finkel (1961) 4 kinderen met acute leukemie, die werden behandeld met 6-mercaptopurine en/of methotrexaat, waarvan er twee overleden. Niet vermeld werd echter hoeveel kinderen er at risk waren en zonder grote problemen genazen. Bodey c s (1964) zagen bij 12 kinderen, lijdende aan een acute leukemie, een waterpokken ontstaan. De incubatietijd was 12-24 dagen met een gemiddelde van 19. Bij 9 kinderen verliep deze ziekte licht. Van deze 9 verkeerden er 8 in complete remissie, een had een partiële rechute. Drie kinderen, twee met een volledige en een met een gedeeltelijke rechute, waren zeer ernstig ziek. Er waren geen sterfgevallen. Aan enkele kinderen werd gammaglobuline toegediend. Dit heeft waarschijnlijk geen invloed meer gehad op het ziekteverloop. Tussen 1960 en 1970 zagen Seligman en Rosner (1970) bij 216 patiënten met een acute lymfoblastaire leukemie 9 keer een waterpokkeninfectie, 8 patiënten herstelden en 1 patiënt overleed aan een (waterpokken?) pneumonie.

De grootste serie patiënten werd beschreven door Schaison c s (1971). Zij namen 34 kinderen waar, lijdend aan een acute leukemie, die een waterpokkeninfectie doormaakten.

Het verloop was goedaardig bij 18 patiënten. Wel was de eruptie uitgebreider dan gewoonlijk en de incubatietijd soms verlengd tot 26 dagen, mogelijk door het profylactisch toegediende gammaglobuline. Van deze 18 kinderen verkeerden er 12 in een complete remissie, 4 hadden een rechute in het beenmerg en bij 2 patiënten bestond er een beenmergaplasie. De waterpokkeninfectie brak slechts bij 4 van de 18 uit tijdens prednisontherapie. De overigen hadden sinds 1 of meer maanden geen corticosteroiden gebruikt.

Bij 11 kinderen was het verloop ernstig en geprolongeerd. Twee hadden een beenmergaplasie, 1 een rechute van het beenmerg, de anderen verkeerden in een volledige remissie. Van deze 11 patiënten hadden er 4 corticosteroiden-therapie ten tijde van de infectie en bij 3 was deze korter dan een maand tevoren gestaakt.

Vijfmaal was er een dodelijke afloop. Drie kinderen waren aan het einde van een remissie-inductie poging, waarbij zij 3 tot 5 weken onder andere prednison hadden gebruikt. Twee kinderen verkeerden in een complete remissie, bij hen ontstond de fatale infectie enkele dagen na een zogenaamde consolidatiekuur, waarbij ook prednison werd gebruikt. De auteurs concluderen, dat de kans op een ernstig beloop niet zozeer afhangt van het stadium van de acute leukemie (remissie, rechute, beenmergaplasie), maar de afloop wel ongunstig wordt beïnvloed door het gebruik van prednison.

### *2.3 Het kwantitatieve aandeel van varicella in fatale infecties tijdens anti-leukemische therapie*

Hoe belangrijk is de waterpokken in relatie tot alle fataal verlopende infec-

ties tijdens de complete remissie? Een indruk hierover geeft Hughes (1971): tussen 1962-1970 werden 490 kinderen gezien met een acute leukemie. Van de 235 sterfgevallen waren er van 199 voldoende gegevens ter beschikking voor een verdere evaluatie zoals: de hematologische status gedurende 30 of meer dagen voor het overlijden, virale onderzoeken en dergelijke en obductiegegevens. Tijdens een floride fase van de ziekte overleden 195 kinderen: bij 89 was de directe doodsoorzaak een infectie, bij 66 waren er bovendien andere complicaties en 40 maal was er geen infectie in het spel. In de groep met infecties waren de verwekkers 2 maal het waterpokken-virus, 2 maal het cytomegalievirus en 7 maal een pneumocytis carinii. Slechts 4 kinderen overleden tijdens een volledige remissie (3 maal pneumocytis carinii, 1 maal hepatitis).

Een uitgebreider artikel uit dezelfde kliniek behandelt de dodelijke infecties tijdens de remissie (Simone c.s. 1972). In totaal werden in 9 jaar 639 kinderen wegens acute leukemie opgenomen. 26 Kinderen hiervan overleden tijdens een complete remissie. Opvallend hoog was het aantal waarbij niet-bacteriële infecties de doodsoorzaak waren. Slechts 2 maal betrof het gedissemineerde waterpokken, één kind had een uitgebreide Herpes zoster en bij 2 kinderen wordt gesproken van een Herpes encefalitis (Herpes simplex? Herpes zoster?).

Wijzelf zagen in 9 jaar driemaal een infectie met een dodelijke afloop tijdens de complete remissie. De verwekkers waren respectievelijk 1 x cytomegalie-virus, 1 x mazelen-virus en 1 x varicella-virus. Deze laatstgenoemde patiënt zal bij de 'eigen waarnemingen' worden vermeld.

### 3. EIGEN WAARNEMINGEN VAN HERPES ZOSTER VARICELLA INFECTIES TIJDENS ANTILEUKEMISCHE THERAPIE.

#### 3.1. Anamnestiche gegevens

Bij opname in een kinderkliniek is het noodzakelijk om onder andere na te vragen of het kind reeds waterpokken heeft doorgemaakt. Bij 101 kinderen, die opgenomen werden wegens acute leukemie was het mogelijk met enige zekerheid anamnestic na te gaan of deze infectie al of niet was doorgemaakt, in de periode voordat de diagnose acute leukemie was gesteld. De anamnestiche gegevens werden aanvankelijk niet geverifieerd door middel van een onderzoek naar de aanwezigheid van antilichamen tegen het varicella-herpes zoster virus. Een dergelijk onderzoek werd wel verricht door Gershon c.s. (1974) en wordt nu hier te lande herhaald onder auspiciën van de Nederlandse Werkgroep Leukemie bij kinderen.

Onze eigen gegevens werden niet vergeleken met een retrospectief onderzoek bij een controlegroep kinderen, die om andere redenen werden opgenomen. Dit lijkt ook niet zinvol, omdat het antwoord op de vraag: wel of geen waterpokken meestal voor het kind zelf uit zo'n controle groep niet van zo'n groot belang is i.t.t. de situatie bij een patiënt met acute leukemie. De vraag zal daarom aan de ouders van de laatstgenoemde patiënten indringender worden gesteld en vaak zal het belang ervan voor hun eigen kind worden toegelicht. Het antwoord zal dan waarschijnlijk ook vaker

juist zijn, omdat de ouders ook beter hun best zullen doen om het goede antwoord te geven. Het is daarom alleszins te betwijfelen of een in alle opzichten identieke controlegroep samen te stellen is.

Bij 101 patiënten met een A.L.L. konden ouders of verzorgers een antwoord geven op deze vraag. De resultaten hiervan zijn weergegeven in tabel IV-1 en IV-2. Hieruit blijkt zeer duidelijk, dat kinderen bij wie de acute leukemie debuteerde onder de leeftijd van 6 jaar voor het grootste gedeelte, namelijk  $\pm 90\%$ , nog geen waterpokken hebben doorgemaakt. Bij de kinderen waarbij deze ziekte op of na de leeftijd van 6 jaar debuteerde, zijn er slechts  $\pm 20\%$  die nog geen waterpokken hebben doorgemaakt.

TABEL IV-1 *Varicella vóór diagnose A.L.L. < 6 jaar*

Debuut A.L.	0	1	2	3	4	5	totaal
geen Va vóór A.L.L.	4	4	10	15	10	12	55
Va vóór A.L.L.	0	0	2	1	2	2	7
totaal	4	4	12	16	12	14	62
Va tijdens A.L.L.		2	3	5	1	2	13

TABEL IV-2 *Varicella vóór diagnose A.L.L.  $\geq$  6 jaar*

Debuut A.L.	6	7	8	9	10	>10	totaal
geen Va vóór A.L.L.	2	3	0	0	5	4	14
Va vóór A.L.L.	2	4	6	2	4	7	25
totaal	4	7	6	2	9	11	39
Va tijdens A.L.L.	1						1

De percentages, berekend uit tabel IV-1 en IV-2 over het wel of niet hebben doorgemaakt van deze infectie zijn uiteraard slechts richtgetallen. Dat de anamnestiche gegevens echter een reële waarde hebben, blijkt uit de leeftijdsverdeling van de 14 en 2 kinderen, die tijdens acute leukemie een waterpokken respectievelijk een gordelroos hebben doorgemaakt. Bij die patiënten, waarbij later in verloop van de ziekte deze infectie optrad, was de anamnese altijd negatief; geen enkel kind maakte de ziekte dus tweemaal door.

Twaalf van de 13 kinderen, die een waterpokken doormaakten, waren jonger dan 6 jaar toen bij hen de diagnose leukemie werd gesteld (tabel IV-1). Slechts een patiënt was net 6 jaar oud toen de leukemie werd gediagnostiseerd (tabel IV-2). Omdat dit kind lijdende was aan een trisomie 21 en nooit naar een kleuterschool was geweest, was de kans extra groot, dat hij nog niet besmet was op 6-jarige leeftijd.

Onze gegevens wijzen er dus op, dat bij die kinderen, bij wie de leukemie vroeg heeft gedebuteerd, de kans op een waterpokken infectie tijdens het verdere verloop nog zeer groot is. Bij die kinderen, bij wie de leeftijd van debuten hoger is dan 5-6 jaar, lijkt de kans erg gering. Deze waarnemingen wijzen retrospectief op de betrouwbaarheid van de anamnese ten aanzien van het al of niet hebben doorgemaakt van waterpokken. Hier-

voor pleit ook, dat wij alleen dan Herpes zoster hebben waargenomen, indien de anamnese ten aanzien van waterpokken positief was. Het is echter de vraag of deze anamnese ook zo betrouwbaar zou zijn indien het ging om het al of niet hebben doorgemaakt van mazelen of rode hond.

### *3.2. Patiënten met een varicella-herpes zoster infectie*

#### *3.2.1. Patiënten met een primo-infectie c.q. waterpokken.*

##### **a. Therapie ten tijde van waterpokken.**

Bij normale kinderen wordt in een deel der gevallen de infectie niet opgemerkt. Omdat wij niet op gezette tijden antilichaamtiters hebben bepaald, weten wij niet of bij een aantal van de patiënten de waterpokken onopgemerkt is verlopen. In totaal werd bij 14 kinderen de diagnose waterpokken gesteld op grond van de eruptie en een positieve anamnese over een contact. Slechts bij enkelen werd een serologisch onderzoek verricht, dat dan echter steeds de diagnose bevestigde.

Twaalf kinderen verkeerden in een volledige remissie ten tijde van de infectie; 9 hiervan werden behandeld met een therapie gebaseerd op de publicatie van Mathé c.s. (1967). Hierbij wordt om de 8 weken een 'consolidatiekuur' gegeven met rubidomycine 20 mg/m<sup>2</sup> op dag 1 en 2, vincristine 2 mg/m<sup>2</sup> op dag 1 van de kuur en prednison 1 dd. 40 mg/m<sup>2</sup> op de dag 1 t/m 5, wat daarna wordt uitgesloten in 4 à 5 dagen.

Als onderhoudstherapie werd gegeven alternerend één cytostaticum: 1 dd. 6-Mercaptopurine 50 mg/m<sup>2</sup>, cyclofosfamide 1 dd. 50 mg/m<sup>2</sup> en methotrexaat 2 x per week 20 mg/m<sup>2</sup> per os.

Vijf kinderen werden behandeld volgens het in onderling overleg opgestelde protocol acute lymfoblastaire leukemie 1973 van de Nederlandse Werkgroep Leukemie bij Kinderen.

Bij twee andere kinderen werd de elders ingestelde therapie hier aanvankelijk voortgezet.

Slechts 2 kinderen ontwikkelden een waterpokken in het verloop van de eerste remissie-inductiepoging met vincristine 2 mg/m<sup>2</sup>/week en prednison 1 dd. 40 mg/m<sup>2</sup>.

Omdat de duur van de antileukemische therapie en de aard ervan (prednison en/of cytostatica) het verloop zouden kunnen beïnvloeden zijn beide ook vermeld (tabel IV-3).

##### **b. Verloop van de ziekte**

Het verloop is in tabelvorm weergegeven op tabel IV-3. Bij de patiënten was de eruptie steeds uitgebreider dan bij normale kinderen werd gezien; dit hing óók samen met het feit, dat de periode waarin nieuwe blaasjes optraden langer duurde dan gewoonlijk het geval is. De totale ziekteduur bij de patiënten, waarbij de ziekte niet ernstig verliep, was daardoor wat langer dan gebruikelijk. Bij de patiënten 4 en 14 werd dit ondanks cytosine-arabioside therapie niet anders. Bij de patiënten 6, 7 en 9 had de ziekte een zeer ernstig verloop; patiënt 6 overleed binnen 24 uur na het begin van de eruptie. Patiënt 7 had zo'n uitgebreide eruptie dat, evenals



TABEL 15-3 *Varicella tijdens antileukemische therapie (steeds A L L)*

Patient	M/V	debuut A L	ziekted A L	leeftijd Va	status A L	therapie A L	verloop van de varicella	therapie t a v varicella bijzonderheden
1	V	1,9	4,1	5,10	C R	M* sinds 28 dagen 50 mg CPA	veel blaasjes ongecompliceerd	geen therapie
2	M	1,8	6 weken	1,10	R I	ALL-1973** R I	weinig blaasjes ongecompliceerd	titerstijging ontbrekend, na 8 mnd H zoster contact patiënt 13
3	V	2,7	1,6	4,1	C R	M* sinds 28 dagen 50 mg 6MP	veel blaasjes, ongecompliceerd	geen therapie
4	V	2,9	0,8	3,5	C R	M* sinds 14 dagen 50 mg 6MP	veel blaasjes, ongecompliceerd	C-ara 1 dd 30 mg s c gedurende 5 dagen
5	M	2,11	0,11	3,10	C R	sinds 300 dagen 1 dd 20 mg MTX	veel blaasjes, ongecompliceerd	10 ml gammaglobuline op 1ste dag van de eruptie
6	M	3,3	3,0	6,3	C R	M* 6e dag prednison 40 mg	foudroyant verloop, pneumonie, zeer veel blaasjes	geen binnen 24 uur overleden na ziekte begin, Marfan-syndroom
7	V	3,4	0,9	4,1	C R	ALL-1973** sinds 7 dagen MTX 30mg/wk 6MP 50mg/dd	geprothraheerd verloop zeer ziek hemorrh blaasjes	C-ara 1 dd 30 mg s c gedurende 5 dagen, waarna celrijk maar zeer geremd beenmerg
8	V	3,5	1,5	4,10	C R	M* 6e dag prednison 40 mg	zeer ziek, he- morrh blaasjes	contact 35 dg vóór eruptie Hzig 24 dg vóór eruptie
9	M	3,6	4,0	7,6	C R	M* 6e dag prednison 40 mg	Va-pneumonie, he- morrh blaasjes, zeer ziek, herstel	contact 27 dagen vóór eruptie gammaglobuline 10 ml, 24 dg voor eruptie, idem 10 ml op dag 1 en dag 2 van eruptie
10	M	3,9	0,11	4,8	C R	M* sinds 18 dagen MTX 2/wk	veel blaasjes on- gecompliceerd	geen therapie
11	M	4,6	2,11	7,5	C R	om de dag 1 mg MTX	veel blaasjes, ongecompliceerd	geen therapie
12	V	5,2	0,7	5,9	C R	M* sinds 14 dagen 50 mg 6MP	weinig blaasjes, ongecompliceerd	geen therapie
13	V	5,9	0,1	5,10	R I	ALL 1973** R I	veel blaasjes, ongecompliceerd	geen therapie, contact niet achter- haald
14	M	6,0	2,8	8,8	C R	M* sinds 50 mg 6MP	veel blaasjes, ongecompliceerd	C ara 1 dd 30 mg s c gedurende 5 dagen, Trisomie 21

*Verklaring*

tijden en leeftijden in jaren, maanden

M\* behandeld vlgs Mathe (zie tekst) A L L 2-1973\*\* volgens protocol N W L K (zie tekst)

C R complete remissie R I remissie inductie CPA cyclofosfamide 6MP 6-mercaptopurine

MTX methotrexaat C-ara cytosine arabinoside Hzig herpeszoster immuunglobuline Alle

doseringen/m2 m u v patienten 5 en 11

bij brandwonden, vanwege het dalend bloedeiwitgehalte plasma transfusies nodig waren. Een pneumonie was bij haar klinisch niet aantoonbaar. Dit was wel het geval bij patiënt 9, die een wat minder uitgebreide eruptie had en bovendien een ernstige bronchopneumonie, waarvoor ondersteunende therapie in de vorm van digitalisatie en een zuurstof tent nodig waren.

Opmerkelijk was het vrij abrupte herstel en het dalen van de koorts na de 7e ziektedag bij dit kind. Drie jaar later zijn de waterpokken littekens bij hem nog steeds goed zichtbaar. Van deze 14 kinderen maakten 8 de ziekte thuis door, een (patiënt 8) verbleef tijdens de ziekte in Frankrijk en werd door ons gezien toen de blaasjes gingen indrogen.

### **c. Behandeling**

Bij de patiënten 6, 7 en 9 was het verloop dermate ernstig, dat we zeer sterk de behoefte voelden aan een doelmatige en efficiënte therapie. De patiënten 4 en 14 kregen cytosine-arabinoside toegediend; op het tijdstip dat zij deze ziekte doormaakten, werd ten aanzien van deze therapie in de literatuur nogal positief geschreven. Zij werden meer uit voorzorg opgenomen dan vanwege de ernst van het ziekteverloop. Ontslag volgde na 6 dagen in goede toestand.

Patiënte 7 werd ook met het genoemde cytostaticum behandeld; de onderhoudstherapie werd gestaakt. In aansluiting aan de therapie met cytosine-arabinoside ontstond een pancytopenie, waarbij in het beenmerg een sterke rijpingsremming gepaard met grote celrijckdom werd gevonden.

Pas na 1-2 weken herstelde dit zich weer, zodat de cytostatische therapie weer hervat kon worden. Twee kinderen (patiënt 5 en 9) kregen gammaglobuline toegediend, momenteel wordt dit echter niet meer als zinvol beschouwd.

### **d. Beschouwing**

Een evaluatie van onze gegevens wordt besproken in paragraaf 4. Voorlopig geloven wij te mogen concluderen, dat de ziekte een zeer wisselend verloop kan hebben. Onze beperkte ervaringen komen overeen met die van Schaison c.s. (1971) en zijn onder andere niet strijdig met hun opvatting, dat ten tijde of vlak na prednisontherapie het ziekteverloop vaak ernstiger is (patiënt 6, 7 en 9). Dat dit niet altijd het geval hoeft te zijn, blijkt uit het gunstige en lichte ziekteverloop bij de patiënten 1 en 13.

#### **3.2.2. Patiënten met een herpes zoster of gordelroos**

Wij zijn van mening, dat deze ziekte bij normale kinderen zeer zeldzaam is. Bij 124 kinderen lijdende aan een acute leukemie werd dit bij drie patiënten waargenomen.

Verder werd het eenmaal gezien bij een patiënte nadat een leukemische transformatie van een gelocaliseerd lymfosarcoom of non-Hodgkin maligne lymfoom was opgetreden. Opvallend is daarentegen, dat wij bij 18 kinderen lijdende aan een M. Hodgkin variërend in leeftijd van 6-14 jaar, 7 x een gordelroos hebben waargenomen.

Van de drie eerstgenoemde kinderen (zie tabel IV-4) verkeerden er 2 in een actieve fase van hun ziekte. Twee waren reeds vele weken behandeld met onder andere prednison (patient 2 en 3). Patient 3 had ten tijde van de gordelroos in het bloed zéér veel lymfoblasten, die in het geheel niet op PHA reageerden (tabel VI-7). Patient 4 werd reeds 7 maanden zonder succes behandeld wegens een subacuut verlopende myeloïde leukemie. Bij alle 4 patienten genazen de lesies in 1 à 2 weken zonder dat een specifieke therapie was toegepast. Steeds waren de lesies beperkt tot een dermatoom en trad geen verdere uitbreiding op. De littekens bleven nog lang zichtbaar.

TABEL IV-4 *Herpes zoster tijdens antileukemische therapie*

Patient	M/V	debuut A I	ziekteduur A L	debuut status H Z A L	Opmerkingen
1	M	1,8	0,10	2,6 C R A L L	therapie vlg. ALL-2-1973 6-MP + MTX sinds 10 dagen, Varicella tijdens R I (patient 2 tabel IV-3) Spontaan herstel
2	V	6,10	0,4	7,2 P R LySa/ A L L	5,9 LySa stadium I, 6, 10 A L L -beeld, gedurende 4 mnd constant op prednison Genezing in 14 dagen
3	M	7,0	1,10	0,10 rechute A L L	sinds 14 dagen R I poging VCR-prednison. Veel blasten in bloed, die niet reageerden op PHA Genezing in 10 dagen
4	M	11,0	0,7	11,7 P R A M L	subacuut verlopende A M L Sinds 5 weken geen cytostatica wegens iatrogene beenmergaplasie Genezing in 14 dagen

Verklaring: zie tabel IV-3 P R: partiële remissie

#### 4. BEHANDLING VAN WATERPOKKEN EN GORDEIROOS TIJDENS EEN ACUTE LEUKEMIE

Bij normale kinderen is geen behandeling nodig, ernstige complicaties zijn zeer zeldzaam en eisen een specifieke behandeling. Bij kinderen die echter steroiden en/of cytostatica krijgen is het risico veel groter dat deze infectie ernstig verloopt. Sinds enkele jaren wordt regelmatig het cytosine-arabinoside (C-ara) vermeld als zijnde effectief bij deze ziekte. Er zijn zeker patienten beschreven met acute leukemie, waarbij de ziekte vlot genas na toediening van C-ara (Drayer c.s. 1971 één patient, Hryniuk c.s. 1972 één patient). Seligman en Rosner (1970) beschrijven een kind lijdende aan een acute myeloïde leukemie, waarbij de ziekte uitbrak tijdens de onderhoudstherapie met één week C-ara en dagelijkse thioguanine, deze patient genas vlot na het staken van de therapie. Houwerzijl (1974) bericht over een, overigens gezonde, 27-jarige vrouw met een zeer ernstige waterpokken pneumonie, die genas in aansluiting op de toediening van C-ara.

Levine c.s. (1972) adviseren om bij waterpokken C-ara eenmaal als 'loading infusion' van 10-30 mg/m<sup>2</sup> toe te dienen en dit te laten volgen door een continu infuus gedurende 48-72 uur met 10-30 mg/m<sup>2</sup> d.d. Dit advies is overgenomen van Hryniuk c.s. (1972). Mijns inziens levert deze laatstgenoemde publicatie echter onvoldoende argumenten voor de werkzaamheid van dit middel op deze wijze toegediend. Waarschijnlijk wel juist is de gedachtengang achter het advies om het C-ara continu te geven.

Het middel wordt namelijk zeer snel in vivo afgebroken en een virostatisch effect wordt alleen bereikt door constante blootstelling van een mogelijk gevoelig virus aan het C-ara. Levine c.s. zijn in hun latere publicatie (1974) wat voorzichtiger geworden in hun advies. Zij vermelden dan, dat adenine arabinoside wél antiviraal, maar niet meylsuppressief zou zijn. De opgegeven referentie was echter nog ergens 'in the press'.

Waterpokken en gordelroos hebben een identieke verwekker. De pathofysiologie van deze twee ziekten is echter geheel verschillend. Eerstgenoemde ziekte is een primo-infectie, terwijl gordelroos een opflukking is in activiteit van nog aanwezig virus, c.q. ontstaat in perioden waarin de immuniteit waarschijnlijk verminderd is. Voor genezing van een infectie zijn eigen immuniteit en eventueel anti-infectieuze middelen noodzakelijk. Het is niet ondenkbaar, dat de kwantitatieve relatie tussen de aspecten van de immuniteit bij deze twee ziekten anders zijn. Dezelfde mate van immuunsuppressie kan daarom ten aanzien van het verloop van waterpokken een ander effect hebben dan ten aanzien van het ontstaan en verloop van gordelroos.

De werkzaamheid van het C-ara is bij beide ziekten daarom waarschijnlijk niet vergelijkbaar; bij gordelroos is deze wel uitvoeriger bestudeerd. Om een indruk te krijgen van de werkzaamheid van het C-ara lijkt het daarom toch nuttig om te zien wat het effect van dit middel bij Herpes zoster is. Nauwkeurige gegevens worden hierover vermeld door Stevens c.s. (1973). Zij behandelden herpes zoster patiënten met 100 mg/m<sup>2</sup> dd. in een druppelinfuus. Daarmee werden bloedconcentraties bereikt van 0,05-0,1 µg/ml. In vitro zouden concentraties van 0,01-0,1 µg/ml 13-90% remming van de virale groei geven; een lagere dosering leek hun daarom niet zinvol. Het middel werd gegeven tot de verdere uitzaaiing stopte en maximaal gedurende 72 uur. De patiënten werden dubbelblind behandeld met of zonder C-ara. De samenstelling van de twee groepen patiënten was wat hun onderliggende ziekte, leeftijd en therapie betreft, vrijwel gelijk. De primaire ziekten waren: M.Hodgkin, non-Hodgkin maligne lymfomen, andere neoplasmata en 3 'gezonden'. De therapiegroep bestond uit 20 patiënten, de controlegroep uit 19 patiënten. Het C-ara bleek geen enkel voordeel op te leveren: integendeel in de behandelde groep duurde de ziekte langer, de antilichaamproductie was minder en ook de locale cellulaire reactie en interferonproductie in de blaasjes bleken geringer te zijn. In de controlegroep was de uitzaaiingsperiode bij geen van de 19 patiënten langer dan 5 dagen, terwijl dit in de C-ara groep bij 5 van de 20 patiënten wél het geval was. Juist het interferon is van groot belang voor een snel verdwijnen van virusdeeltjes uit de huidlesies (Merigan 1974).

Het gunstige effect van C-ara beschreven door Hall c.s. (1969), bewijst ons

inziens evenmin, dat C-ara beter is dan onspecifieke therapie. De groep Herpes zoster patiënten van Fortuny c.s. (1973) zouden allen gunstig op C-ara-therapie gereageerd hebben. Het betrof allen patiënten met een ge-localiseerde vorm van Herpes zoster en de ziekte duur bedroeg ondanks/dankzij de therapie 3-9 dagen. Tien patiënten vermeld door Reis c.s. (1973) zonder onderliggende ziekte en zonder cytostatische therapie zouden een snelle teruggang met pijnvermindering hebben vertoond van de Herpes zoster leisis. Met het dubbelblind onderzoek van Davis c.s. (1973), waarbij gedurende 36 uur 150 mg C-ara per infuus werd toegediend, kon geen nuttig effect worden aangetoond bij patiënten met een gedissemineerde Herpes zoster.

Wilfert c.s. (1972) betwijfelen ten eerste of C-ara ook bij de primaire infectie i.c. de waterpokken effectief zou zijn. Ondanks een enkel positief geluid (bijvoorbeeld Prager c.s. 1971), lijkt de werkzaamheid bij de primo-infectie c.q. de waterpokken nog geenszins bewezen.

Uit de ervaringen van onder andere Bodey c.s. (1964), Schaison c.s. (1971) en de observaties hier vermeld, blijkt dat het verloop vaak licht is en in ieder geval onvoorspelbaar. Wijzelf pasten C-ara tweemaal toe bij kinderen, die met of zonder middel waarschijnlijk een gunstig verloop zouden hebben gehad. (zie tabel IV-3). Een derde patiënt werd door ons C-ara toegediend, omdat de ziekte fataal dreigde af te lopen (zie 3.2.1.c). Post op propter trad een ernstige beenmergdepressie op met een remming in de uitrijping van de rode en de witte reeks.

Samenvattend lijkt het ons, dat ten aanzien van de behandeling van waterpokken onder cytostatische therapie en eventuele prednison therapie de volgende maatregelen genomen moeten worden:

1. Tijdelijk staken van de cytostatische therapie; dit werd door ons steeds gedaan en leek geen groot risico ten aanzien van een recidief op te leveren.

2. Ten aanzien van een eventuele prednisontherapie: het lijkt ons verstandig deze snel te verminderen c.q. te staken. Indien de prednison 1 dd. 's ochtends wordt gegeven is abrupt staken waarschijnlijk beter mogelijk dan wanneer de medicatie over de dag verdeeld is gegeven. Grote hoeveelheden corticosteroiden hebben géén gunstig effect op het verloop van de ziekte (Schaison c.s. 1971).

3. Ten aanzien van het C-ara: een lage dosis tot 1 dd. 30 mg/m<sup>2</sup> wordt goed verdragen, mits andere cytostatische therapie is gestaakt. Het is geenszins bewezen, dat een dergelijke dosis effectief is. Een hogere dosis, 100 mg/m<sup>2</sup> dd., zou theoretisch effectief kunnen zijn. Bij Herpes zoster blijkt dit echter niet zo te zijn en het achterwege laten van C-ara is zelfs te prefereren boven de toediening ervan. Bij varicella is een gunstig effect nog niet bewezen of weerlegd.

## 5. DE ROL VAN GAMMAGLOBULINE IN DE PREVENTIE EN THERAPIE VAN VARICELLA-HERPES ZOSTER-VIRUS INFECTIES

Het is reeds lang bekend (Brugsch 1963) dat waterpokken, evenals maze-

len, in de eerste drie levensmaanden nauwelijks voorkomt. Het is aan-  
nemelijk, dat dit te danken is aan een bescherming door gammaglobulinen  
afkomstig van de moeder. Een groot en zorgvuldig onderzoek leverde op,  
dat een infectie met 0,4-1,2 ml 16% gammaglobuline/kg/lichaamsgewicht  
binnen 72 uur na een contact met waterpokken toegediend zeker een ge-  
mitigeerd ziekteverloop van deze ziekte gaf, maar nooit een volledige  
preventie werd gezien (Ross c.s. 1962).

Bleek 'gewoon' gammaglobuline zelfs in deze hoge en pijnlijke dosering  
weinig effectief, het Herpes zoster immuunglobuline is daarentegen een  
aanwinst in het therapeutisch-profylactisch arsenaal gebleken. Brunell c.s.  
(1969) bereidden dit uit plasma van patiënten die kort tevoren hersteld  
waren van een Herpes zoster infectie en op het moment van afname een  
Herpes zoster complement bindingsreactie (C.B.R.) titer hadden van meer  
dan 1/256. Twee ml van een oplossing bevattende 16,5% gammaglobuline  
afkomstig van dergelijke reconvalescente Herpes zoster patiënten, gaf bij  
6 kinderen een volledige preventie. Zes controle kinderen kregen een  
gelijke dosis, maar afkomstig van gewone donores. De dosis kwam in beide  
groepen neer op 0,04-0,07 ml/kg lichaamsgewicht. Bij de kinderen die met  
Herpes zoster immuunglobuline (H. Zig) waren behandeld en die geen  
varicella ontwikkelden, werd later met de bovengenoemde C.B.R. geen  
titerstijging vastgesteld.

Een van de meest recente onderzoeken is dat van Gershon c.s. (1974).  
Naast de C.B.R. werd een gevoeliger test gebruikt, waarbij antilichamen  
tegen celmembranen van met varicella Herpes zoster-virus geïnfecteerde  
humane longfibroblasten worden aangetoond. Op deze wijze kan met meer  
zekerheid worden aangetoond of een patiënt ontvankelijk is voor een in-  
fectie.

Van de 21 met H. Zig behandelde kinderen hadden er 18 een leukemie of  
een andere maligne aandoening waarvoor cytostatica werden gegeven; de  
drie overige kinderen hadden respectievelijk een gecombineerde immuun-  
deficiëntie, een thymusaplasie en een getransplanteerde nier. Deze kinde-  
ren kregen 3-5 ml. H. Zig binnen 72 uur na contact. Bij de reeds 6 sero-  
positieve kinderen werden geen ziekteverschijnselen of titerstijgingen  
waargenomen. Bij de seronegatieve kinderen was het beloop 9 maal zeer  
licht: 2-44 blaasjes, vijfmaal verliep de ziekte klinisch onopgemerkt, één  
patiënt was ernstig ziek, maar herstelde overigens zonder complicaties.  
Deze 15 patiënten waren met de zeer gevoelige membraan-test positief ge-  
worden, hetgeen wijst op een ontstaan van een status van immuniteit. Hun  
ervaringen ten aanzien van de correlatie van de anamnese met het sero-  
logisch bewijs dat kinderen de ziekte al of niet hadden doorgemaakt, zijn  
niet in strijd met onze indruk, dat de anamnese belangrijk is maar niet al-  
tijd zeker is: Van de kinderen die 3 jaar of jonger waren en waarbij de  
anamnese negatief was, bleek inderdaad 80% seronegatief te zijn, terwijl  
dit bij kinderen van 9 jaar en ouder slechts bij 35-40% het geval was. De-  
zelfde gunstige ervaringen vermelden verder Judelsohn c.s. (1974) bij 56  
'high risk' patiënten, waarvan er 25 lijdende waren aan een acute leukemie.  
Bij 34 patiënten die hierop werden onderzocht 4-8 weken na toediening

van het H-Zig werd bij 10 hiervan een duidelijke titerstijging waargenomen Slechts 2 hiervan hadden een klinisch herkenbare varicella, beide in lichte vorm, doorgemaakt Bij de overige 24 van deze groep kon dus geen titerstijging c.q. een mogelijk blijvende immuniteit worden aangetoond Dit betekent, dat aan deze groep patienten bij een hernieuwd contact weer H Zig toegediend moet worden

Onze eigen ervaringen bij 6 kinderen, die wegens een contact met waterpokken tijdig via bemiddeling van Collega Huisman (GGGD Rotterdam) Herpes-zoster immuunglobuline kregen, zijn even gunstig geen enkel kind kreeg waterpokken

Ten aanzien van het effect van 'gewoon' of hyperimmuungammaglobuline bij Herpes zoster moet in de eerste plaats bedacht worden, dat deze ziekte geen incubatietijd heeft Daardoor is een preventieve toediening niet mogelijk Over het effect bij manifeste gordelroos hebben wij geen gegevens kunnen vinden

Samenvattend kan men dus stellen, dat het Herpes zoster immuunglobuline bij de preventie van waterpokken een werkelijke aanwinst is, betrekkelijk kleine volumina worden toegediend en zijn effectief, t.t.t. de massale hoeveelheden gewoon gammaglobuline die zeer pijnlijk zijn, maar slechts een dubieus effect hebben

Van belang is vooral het tijdig toedienen van de kleine hoeveelheden 2 tot 4 ml, die dan effectief zijn gebleken Zeer kleine hoeveelheden specifieke antilichamen kunnen herinfecties voorkomen (Humphrey en White 1971) Met deze, op het circulerend bloedvolume berekende, minimale concentraties verkregen door giften van H Zig kan men de patient kortdurend en effectief de status bezorgen zoals die bij kinderen die de ziekte reeds hebben doorgemaakt, steeds aanwezig is

De literatuur, en onze persoonlijke ervaringen wijzen er op, dat waterpokken eenmaal vóór het begin van de ziekte doorgemaakt, niet recidiveert Het immunologisch geheugen blijft ten deze kennelijk in voldoende mate intact Toediening van het H Zig is bij deze groep patienten dan ook niet nodig Een mitigerende invloed op een manifeste waterpokken is van het H Zig echter niet te verwachten (Huisman 1974) en toediening ervan in dit stadium is zinloos

#### CONCLUSIE

Een op zich eenvoudig lijkend probleem waterpokken en antileukemische therapie blijkt bij analyse van literatuur en eigen gegevens toch nog steeds niet duidelijk te zijn Hoewel het ziekteverloop zeer ernstig en dodelijk kan zijn, is een licht verloop evengoed mogelijk en waarschijnlijk veel frekwenter

Met intensivering van de antileukemische therapie zal de kans op een ernstiger verloop mogelijk toenemen

Bij Herpes zoster lijkt het gebruik van C-ara géén winst op te leveren en zelfs nadelig te werken Bij de waterpokken is o.i. evenmin bewezen, dat dit middel nuttig is, een enkele eigen ervaring, hier vermeld, wijst op een schadelijke werking Nochtans zal men zich bij een ernstig zieke patient

afvragen of men tòch dit middel zal toedienen bij gebrek aan een andere bewezen doeltreffende therapie.

Profylaxe met het H. Zig is bij kinderen onder cytostatische therapie of met sommige typen immuundeficiënties echter bijzonder effectief gebleken.

Het doormaken van een varicella heeft op zich géén effect op het verloop van de acute leukemie. Het toedienen van een hoge dosis corticosteroiden bij een manifeste ziekte heeft zeer waarschijnlijk geen zin, tenzij dit een onderdeel vormt van een shock-bestrijding.



IMMUUNSUPPRESSIE ALS GEVOLG VAN ANTILEUKEMISCHE  
THERAPIE, POGINGEN TOT KWANTIFICERING

## INIFIDING

Bij de acute lymfoblastaire leukemie lukt het, bij kinderen althans, vrijwel steeds om een volledige remissie te verkrijgen. Het ziekteverloop kan in de eerste weken van de behandeling stormachtig zijn. Bij de behandeling van die patiënten, waar primair de kans op complicaties reeds zeer groot lijkt, is verpleging in klinieken met veel ervaring geïndiceerd. Bij de acute myeloïde leukemie zijn, zowel bij kinderen als volwassenen, de kansen op een volledige remissie veel geringer en de complicerende problemen, tijdens deze poging daartoe, nog veel groter. Het laatste betekent, dat de behandeling van patiënten met dit type leukemie eigenlijk alleen in centra kan plaats vinden.

Ter verlenging van de remissieduur is bij beide acute leukemietypen een voortgezette behandeling in de vorm van een onderhoudstherapie, al of niet afgewisseld met zogenaamde consolidatiekuren, noodzakelijk. De aard en de doseringen van de therapie gegeven tijdens de remissie wisselt volgens de diverse protocollen. Dit wijst erop, dat enerzijds het huidige therapeutisch arsenaal onvoldoende is en anderzijds, dat nog niemand het ideale therapieschema heeft kunnen leveren.

De laatste jaren is er, mede door toegenomen ervaring, een tendens om tijdens de remissie zo hoog mogelijk te doseren en zoveel mogelijk cytostatica tegelijk toe te dienen (Simone, 1974, Beard en Hamilton Fairley 1974). Dit komt ook tot uiting in het tweede therapieschema (protocol acute lymfoblastaire leukemie 1973-2,) van de Nederlandse werkgroep leukemie bij kinderen (N.W.L.K.), waarin de onderhoudstherapie zeer veel zwaarder is dan in het eerste protocol van deze werkgroep.

Hierdoor zal de eerste volledige remissie veel langer kunnen duren. Bij kinderen lijdende aan een acute lymfoblastaire leukemie bestaat daardoor zelfs een reële kans op genezing in een deel der gevallen.

Deze intensieve therapievormen verminderen echter in sterkere mate de natuurlijke afweer tegen infecties en zijn in dat opzicht voor de patiënt niet zonder risico's. In dit hoofdstuk zal getracht worden, naar aanleiding van literatuurgegevens en eigen onderzoeken na te gaan of deze afweervermindering meetbaar is.

Indien zulks het geval mocht zijn, zou de individuele patiënt beter tegen dit risico beschermd kunnen worden. Het eigen onderzoek betreft steeds de afweervermindering door het lymfoïde systeem, de onderzochte patiënten zijn altijd kinderen geweest die in een eerste remissie verkeerden van hun A.L.L.

Op grond van de beschikbare gegevens (zie hoofdstuk III) mag men aannemen, dat specifieke stoornissen in de immuniteit geen primair onderdeel vormen van de symptomatologie van de acute leukemie. Dit is in tegenstelling tot de situatie bij de M. Hodgkin en de chronische lymfatische leukemie, waarbij min of meer uitgesproken stoornissen wel tot de symptomatologie kunnen behoren.

In de floride fasen van de acute leukemie kan door overwoekering en infiltratie door leukemische cellen in beenmerg, milt en lymfeklieren natuurlijk wel in tweede instantie een verminderde afweerfunctie optreden. Tijdens de volledige remissie is hiervan echter geen sprake meer en kunnen ook daardoor geen stoornissen worden verwacht. De waargenomen toename in frekwentie en in ernst van infecties tijdens de remissie mag derhalve gevoeglijk geweten worden aan de afweer-verminderende werking van de antileukemisch bedoelde therapie. Als klinisch voorbeeld van deze iatrogene afweerstoornis werd in hoofdstuk IV het ziekteverloop van waterpokken en herpes zoster beschreven.

Deze afweervermindering betreft natuurlijk niet alleen het verloop van waterpokken. Het aantal publicaties over vele andere, hierdoor abnormaal verlopende infecties is legio; voor een recent overzicht van deze problematiek moge verwezen worden naar de artikelen van Levine c.s. (1974) en Leventhal c.s. (1974). Speciaal op kinderen, lijdende aan acute lymfoblastaire leukemie, is de aandacht gericht in de publicatie van Simone c.s. (1972). Vanaf 1 januari 1962 tot 1 juli 1971 werd door hen bij 499 kinderen de diagnose gesteld; zij zagen hierbij 26 maal een dodelijk verlopende infectie tijdens de complete remissie. Uit hun gegevens valt ook duidelijk op te maken, dat deze fatale infecties in frekwentie toenamen vanaf het moment van invoering van een agressievere en intensievere antileukemische therapie.

Het betreft echter niet zozeer een toename in frekwentie van die infecties, die ook nu nog voor overigens gezonde kinderen dodelijk kunnen verlopen, zoals meningococcensepsis, epiglottitis, fulminante gastro-enteritiden en dergelijke. Niet deze ziektebeelden bepaalden de toename in frekwentie van fatale infecties; een geheel ander scala van ziekten en verwekkers werd geconstateerd: virus-encephalitiden, pneumocystis carinii-pneumonieën, cytomegalie en varicella infecties, cerebrale toxoplasmose.

Deze bevindingen van Simone c.s. (1972) zijn geenszins uniek; de toename in frekwentie van ernstige infecties tijdens therapie met cytostatica en corticosteroiden wordt door vele auteurs (zie Levine c.s. 1974) bevestigd, zowel bij de acute leukemie als bij andere aandoeningen. Onze eigen ervaringen zijn hiermee ook in overeenstemming: drie kinderen, allen verkerend in een volledige remissie van een acute lymfoblastaire leukemie, overleden aan een virale infectie: respectievelijk gegeneraliseerde waterpokken, cytomegalie-encefalitis en een interstitiële pneumonie veroorzaakt door het mazelen virus. Een kind maakte een hemolytisch-uremisch syndroom door, waarvan het overigens goed herstelde. Bij ons weten is het

optreden van dit syndroom tijdens cytostatische therapie niet eerder in de literatuur vermeld. Het bovenstaande betreft voor een zeer groot deel infecties tijdens de remissie, het ziektepatroon is dan anders dan in de floride fasen van de ziekte. In die fasen is er een duidelijk verband tussen de neutropenie ten gevolge van beenmergoverwoekering en de eventuele antileukemische therapie en de aard der optredende infecties. Het betreft dan veelal bacteriële infecties, zoals stafylococcus aureus of E.coli sepsis, bacteriële pneumonieën en dergelijke. Deze infecties plegen volgens onze ervaringen pas vlot te gaan genezen, indien de neutropenie verdwijnt door de regeneratie van het beenmerg. Bij de myeloïde leukemieën blijft deze vaak uit en blijven koortsende aandoeningen tot de dood toe bestaan; of bij dit type leukemie infecties altijd de oorzaak van de koorts zijn, is misschien te betwijfelen.

De literatuurgegevens en de persoonlijke ervaring samenvattend, kan men het volgende opmerken ten aanzien van infecties optredend tijdens anti-leukemische therapie:

1. relatief vaak verlopen deze fataal
2. vaak ontstaan zij geheel onverwachts
3. uit de literatuur is niet steeds op te maken of dit soort infecties in ernst gecorreleerd is aan iatrogene neutropenie en/of lymfopenie.
4. tijdens de incubatie-tijd kan passieve immunisatie de patiënt zeer goed behoeden voor een ernstig ziekteverloop (mazelen, waterpokken).
5. een aantal infecties verloopt vaak ernstig, hoewel dezelfde verwekkers bij normale kinderen geen of veel minder ernstig verlopende ziekten veroorzaken (pneumocystis carinii, cytomegalie virus, toxoplasma gondii).
6. niet alleen het aantal en de ernst van de infecties is toegenomen; ook het gehele ziektepatroon ten aanzien van verwekkers en de ernst van het ziekteverloop is geheel anders dan bij normale kinderen.
7. tijdens de remissie-inductie fasen lijken bacteriële infecties te overheersen, terwijl in de remissieperiode protozoaire en virale infecties vooral gezien worden.

## 2. DE NORMALE AFWEER TEGEN MICRO-ORGANISMEN

Wanneer men wil analyseren in hoeverre cytostatica en corticosteroiden de afweer negatief kunnen beïnvloeden, dient men zich eerst te realiseren op welke wijze deze normaal functioneert. De verschillende onderdelen van de afweer zijn functioneel en histologisch-anatomisch nauw met elkaar verweven, nochtans kan men drie hoofd-onderdelen onderscheiden, die hieronder in het kort zullen worden besproken;

- 2.1. de afweer door intacte huid en slijmvliezen
- 2.2. de afweer door fagocytose
- 2.3. de afweer door het lymfoïde systeem.

### 2.1. De afweer door de intacte huid en slijmvliezen

Afgezien van haaruitval lijkt de huid meestal niet zichtbaar te lijden onder corticosteroiden of cytostatische therapie. Kleinere en grotere iatrogene lesies genezen mogelijk minder vlot. De aandacht voor een goede huid-

hygiëne en een zorgvuldige verzorging van vingerprik en venapunctie-openingen moet echter een geïntegreerd onderdeel vormen van de behandeling. De slijmvliezen van de tractus digestivus bevatten veel lymfocyten en in hun secreten worden immuunglobulinen aangetroffen. In hoeverre deze in aantal respectievelijk hoeveelheid door de therapie worden verminderd is nauwelijks bekend.

Lesies van het mondslijmvlies worden vaak gezien, vooral bij het gebruik van methotrexaat. Blijkens onze ervaringen leiden deze lesies tijdens de remissie van de acute lymfoblastaire leukemie zelden of nooit tot een sepsis. Onder cytostatische therapie worden af en toe heftige gastro-enteritiden gezien met waterdunne diarree. In hoeverre soortgelijke lesies als in de mond hiervoor mede aansprakelijk kunnen zijn is onbekend.

Een integrerend, maar overal verwaarloosd onderdeel van de tractus digestivus vormt het gebit; in dit verband is op te merken, dat juist bij deze therapieën hieraan extra zorg moet worden besteed. Het toepassen van een goede gebitshygiëne en het gebruik van fluor door het kind wordt in onze kliniek steeds met klem aan de ouders geadviseerd.

Wat de luchtwegen betreft: het is o.i. niet uitgesloten, dat bijvoorbeeld pneumocystis carinii pneumonieën eerst mogelijk worden door een beschadiging van de slijmvliezen als gevolg van de antileukemische therapie. Een dergelijke genese lijkt ook niet onmogelijk te zijn voor de zogenaamde methotrexaat-long (Robbins c.s. (1973).

De pneumonie is daarbij secundair aan een iatrogene beschadiging van het bronchus-epitheel.

Hoewel opstijgende urineweginfecties bij normale jonge meisjes niet ongebruikelijk zijn, vermeldt de literatuur (Levine c.s. 1974) niet een toename in frekwentie tijdens de therapie. Ook onze ervaringen wijzen niet duidelijk hierop. Ten overvloede zij opgemerkt, dat in de floride fasen van de ziekte, mede door de dan vaak aanwezige neutropenie, binnengedrongen bacteriën niet snel genoeg geëlimineerd worden en een sepsis gemakkelijk optreedt. Juist in die fase van de ziekte blijft naast een eventuele geïsoleerde verpleging e.d. een goede hygiëne van even vitaal belang.

## *2.2. De afweer door fagocytose*

Fagocytose, het opnemen en verteren van levende of dode lichaamsvreemde deeltjes, is een functie van de macrofagen en de microfagen. De microfagen, in feite de neutrofiele granulocyten, 'eten' niet minder dan de macrofagen, maar zij nemen de kleinere deeltjes op. De vergelijking doortrekkend: snoeken zijn macrofagen en baleinwalvissen zijn microfagen. Uit de monocyt ontstaan de macrofagen, die grotendeels in de weefsels verblijven (weefselmacrofagen of histiocyten, Kupffercellen, alveolaire macrofagen). Doordat deze celsoort dus grotendeels in de weefsels te vinden is, is een kwantificering van hun aantal klinisch niet goed doenlijk. Het aantal beschikbare microfagen laat zich beter oriënterend bepalen, omdat dit in zekere mate gecorreleerd is met het aantal neutrofiele granulocyten in het bloed. Het te mobiliseren potentieel aan fagocyterende cellen is kwalitatief en in zeer beperkte mate na te gaan met bijvoorbeeld

de Rebuck-window techniek waarbij gebruik wordt gemaakt van dekglasjes op een huidlesie. Holland c.s. (1971) hebben deze methode enigszins gewijzigd door op de gemaakte huidlesie een plastic kamertje gevuld met serum te plaatsen. Zij zijn van mening, dat hierdoor een kwantitatieve studie van de leucocyten mobilisatie mogelijk is. Laatstgenoemde methode bleek in onze kliniek echter niet te reproduceren. Bepalingen van de functionele capaciteit (mobilisatie, migratie, fagocyterend vermogen, bacteriedodend vermogen) zijn uiterst moeilijk en lenen zich er niet voor om als dagelijkse routine bepaald te worden.

Vermindering in aantal en/of achteruitgang in functie zou kunnen leiden tot bijvoorbeeld etterige huidontstekingen, osteomyelitiden of etterige pyelonefritiden. Tijdens de floride fasen van de ziekte worden met name deze huidontstekingen zeker vaak waargenomen.

Opvallend is dan vaak het sereuze aspect van de etter, wijzend op een te geringe bijdrage van granulocyten aan het exsudaat. Tijdens de remissieperiode van met name de acute lymfoblastaire leukemie worden huidontstekingen echter zelden gezien. De kans op etterige ontstekingen tijdens de remissie zal zeker verminderd worden door factoren zoals optimale lichamelijke en huiselijke hygiëne, optimale voeding en kleding. Het is zeker denkbaar, dat dit soort aandoeningen vaker worden waargenomen indien deze facetten minder optimaal zijn.

Een andere reden voor de betrekkelijk geringe frekwentie van dergelijke bacteriële infecties tijdens de remissie wordt misschien gevormd door de bijna universele gewoonte om de dosering van cytostatica in te stellen op het leucocyten c.q. granulocyten-aantal in het bloed. De ervaring bij aplastische anemieën heeft immers ook geleerd, dat ernstige bacteriële infecties pas dan optreden wanneer het aantal neutrofiele segmentkernigen in het bloed lager is dan 1500/mm<sup>3</sup>. Terloops zij opgemerkt, dat bij persisterende neutropenieën antibiotica alléén vaak onvoldoende zijn om genezing te bewerkstelligen.

De neutrofiele segmentkernige leucocyten en de macrofagen laten de oervorm van de afweer zien: het pathogene agens wordt opgenomen en verteerd. In hoeverre subtielere afweerfuncties zoals het complementsysteem, opsoninen e.d. hierbij ook een rol spelen, zou te ver voeren om hier te bespreken.

### *2.3. De afweer door het lymfoïde systeem*

Fagocytose werd door Metchnikof bij zeer primitieve ongewervelde dieren ontdekt; deze afweervorm speelt bij de gewervelde dieren nog steeds een onontbeerlijke rol. Bij deze diersoort heeft zich daarbij ook het zogenaamde lymfoïde systeem ontwikkeld, waardoor o.a. een uiterste verfijning in de gerichtheid van de afweerreactie op het ziekmakende micro-organisme, zijn bestanddelen van wand of inhoud of zijn metaboliëten (toxinen) mogelijk is.

De 'effector' cel van dit systeem is de lymfocyt; lang zijn deze cellen beschouwd als kleine, onopvallende cellen, die daardoor waarschijnlijk ook wel niet interessant zouden zijn (Meuwissen c.s. 1969). Deze cellen spelen

ongetwijfeld een vitale rol bij de afweer tegen vele pathogene micro-organismen en met name bij de afweer tegen virale infecties waarbij de afweer door granulocyten ontoereikend is.

Virale infecties zijn nauwelijks medicamenteus behandelbaar; een iatrogene beschadiging of depressie van juist dit lymfoïde systeem moet dan ook als zeer riskant beschouwd worden. Het zoeken naar een betrouwbare parameter van de immuunsuppressie van dit systeem is een van de activiteiten waarmee wij ons de laatste jaren in de kinderkliniek hebben bezig gehouden. In dit verband lijkt een korte uiteenzetting van de taak en werkwijze van het lymfoïde systeem op zijn plaats.

### 2.3.1. Opbouw, functie en werkwijze van het lymfoïde systeem

Voor enkele overzichtsartikelen moge verwezen worden naar: Meuwissen c.s. 1969, Granger 1971, Craddock c.s. 1971. Omdat de kennis van dit systeem voor een groot deel bij de lezer bekend mag worden geacht, zullen slechts die punten worden besproken die in dit kader van belang (kunnen) zijn. Lymfocyten worden nog steeds onderscheiden in twee grote hoofdklassen:

1. de zogenaamde thymusafhankelijke lymfocyten of 'T'-lymfocyten.
2. de zogenaamde bursa-afhankelijke lymfocyten of 'B'-lymfocyten.

*Ad. 1.* Deze groep is fylogenetisch de oudere groep. Indien zij in contact komen met een immunogeen werkend micro-organisme kunnen zij zogenaamde mediatorsubstanties produceren ('lymfokinen') waardoor o.a. macrofagen gemobiliseerd worden, andere lymfocyten worden aangetrokken en een eventuele specifieke gevoeligheid voor het immunogeen op andere, nog niet gevoelige of gesensibiliseerde lymfocyten kan worden overgedragen. Deze lymfokinen zijn werkzaam in een zeer klein gebied rondom de lymfocyt, zij zijn uiterst moeilijk te kwantificeren.

Een kwantitatief en kwalitatief voldoende functie van T-lymfocyten is noodzakelijk voor het gunstige verloop van de immunresponse c.q. het effectief elimineren van vele pathogene micro-organismen. Alhoewel bij de gehele immunresponse T- en B-lymfocyten met andere cellen samen verantwoordelijk zijn voor de goede afloop, is het zeer waarschijnlijk dat T-lymfocyten hierbij een primaire rol spelen en dat een gebrekkige functie van deze celsoort slechts ten dele of soms in het geheel niet door de andere celsoorten betrokken bij de immunresponse opgevangen kan worden (Elves 1972).

*Ad. 2.* De fylogenetisch jongere groep bursa-afhankelijke, zog. B-lymfocyten, is via de transformatie tot plasmacellen verantwoordelijk voor de vorming van de immuunglobulinen met hun uiterst grote specificiteit ten opzichte van antigenen, die als losse moleculen kunnen voorkomen of onderdelen kunnen zijn van de wand of de inhoud van micro-organismen. De naam B-lymfocyten vereist enige toelichting. Tijdens de fylogenie van de vertebraten ziet men een verfijning en differentiatie van de lymfocyten-functie. Vanaf het stadium van de reptielen is er enerzijds een

differentiatie geweest in de richting van de vogels. Deze hebben daarbij naast de thymus een zogenaamde bursa van Fabricius ontwikkeld, een orgaan dat bij vogels van wezenlijk belang is voor het tot stand komen van een normale B-lymfocyt-functie. Bij zoogdieren heeft men gezocht naar een orgaan of weefsel, dat een equivalent zou kunnen zijn van de bursa (tonsillen, plaques van Peyer, appendix); dit zoeken heeft geen resultaat gehad. Gezien de splitsing in de fylogenie vanaf reptielen enerzijds in de richting van de vogels, anderzijds in de richting van de zoogdieren, is dit ook wel voorstelbaar. Beide klassen van gewervelde dieren hebben kennelijk het B-lymfocytenstelsel verfijnd: de organisatie (functioneel-histologisch) is waarschijnlijk bij beide klassen anders geregeld. Ook bij zoogdieren en bij de mens wordt daarom gesproken van bursa-afhankelijke of B-lymfocyten.

De interpretatie dat deze B op de 'B' van beenmerg slaat is o.i. onjuist: in het beenmerg komen evenals in lymfklieren en in de milt T en B lymfocyten voor. Bovendien vindt de eerste differentiatie van stamcellen tot zowel de T als B-lymfocyten in het beenmerg plaats. Voor de menselijke pathologie is de term B-lymfocyt daarom wat ongelukkig: ook de mens heeft géén bursa van Fabricius. Dat deze cellen hun oorsprong in het beenmerg hebben, geldt evenzeer voor de T-lymfocyten. Nochtans is deze benaming internationaal teveel ingeburgerd om vervanging door een andere naam opportuun te maken. Onder volwaardige B-lymfocyten dient men bij het zoogdier dus te verstaan die lymfocyten, die zich tot plasmacellen kunnen transformeren. De B-lymfocyten zijn daardoor dus uiteindelijk verantwoordelijk voor de vorming van immuunglobulinen.

### 2.3.2. Is capaciteit en functie van het lymfoide systeem te meten?

Van longen, nieren enz. zijn de capaciteit en de functie en ook dus verminderingen daarvan vrij eenvoudig en met een geringe belasting voor de patiënt te meten. Ten aanzien van het lymfoide systeem is het met wat meer en wat gecompliceerdere bepalingen zeker goed mogelijk om na te gaan of dit systeem in grote lijnen goed functioneert en of bepaalde 'onderdelen' in redelijk voldoende mate aanwezig zijn.

Om praktische redenen zijn bij een aantal onderzoeken niet of niet goed herhalingen hiervan mogelijk (lymfklierbiopsieën, sensibilisatie van de huid met DNCB, booster- en primovaccinaties).

Bij het functie- en capaciteitsonderzoek van het lymfoide systeem komt nog een zeer bijzondere moeilijkheid, die bij het functie-onderzoek van in omvang tamelijk gefixeerde organen nauwelijks een rol speelt. Deze organen werken meestal ver onder hun maximale belasting en veranderen nauwelijks in omvang wanneer de belasting tijdelijk toeneemt.

Bij het lymfoide systeem dient men echter duidelijk te onderscheiden tussen: de aanwezigheid van alle elementen, i.c. T en B-lymfocyten, lymfklieren, thymus enz. enz.,

de mogelijkheid om op elk moment in celdental abrupt toe te nemen en de productie van specifieke producten (immuunglobulinen, enz.) te kunnen verhogen.

Immers elk moment kan een invasie van een pathogeen micro-organisme optreden, tengevolge waarvan de cellen van dit systeem onmiddellijk moeten gaan delen, prolifereren, secerner enz. Er is dus een rusttoestand en een alarmtoestand met een sterk verhoogde activiteit.

### 2.3.3. Keuze van een parameter van de immuunsuppressie van het lymfoïde systeem.

De ongewenste werkingen van cytostatica op het beenmerg laten zich voor een deel gemakkelijk controleren door controles van het bloedbeeld. Therapie-aanpassingen kunnen hierdoor op het juiste moment worden aangebracht. Omdat ernstige infecties tijdens de complete remissie vaak onverwacht komen, ware het wenselijk, dat de luxerende immuunsuppressie ook even betrouwbaar meetbaar was als bijv. het trombocyten aantal. Het dreigende risico van de iatrogene neutropenie is duidelijk herkenbaar; klinisch is immers het aantal in het bloed circulerende granulocyten eenvoudig meetbaar. Dit aantal is nauw gelieerd aan de kans op bacteriële infecties.

In het onderstaande willen wij slechts spreken over de mogelijkheden tot meting van de afweervermindering van het lymfoïde systeem.

Welke mogelijkheden zouden er nu kunnen zijn?

a. ten aanzien van de humorale, c.q. B-lymfocyt-afhankelijke immuniteit: Bepaling van immuunglobuline-spiegels in het bloed is zeker uitvoerbaar. De waarde hiervan voor de individuele patiënt is echter zeer betrekkelijk o.a. omdat:

- de normale spreiding vooral bij kinderen zeer groot is; vooral bij kleuters vrij vaak infecties voorkomen van de luchtwegen en de tractus digestivus. De frekwentie en de duur zijn weer van invloed op de productie en dus op de bloedspiegels;

- wanneer infecties niet vlot genezen, bloedspiegels sterk op kunnen lopen; de halfwaardetijd van bijv. IgG afneemt als de productie toeneemt.

O.i.v. cytostatische therapie nemen de spiegels van immuunglobulinen af, dit geldt voor een weinig intensieve onderhoudstherapie (Freund c.s. 1969) en zeker bij de meer intensieve therapie-schema's die nu in gebruik zijn. Terloops zij opgemerkt, dat dit ook reeds tot uiting komt in een vaak duidelijk laag totaal gammaglobuline gehalte, bepaald met de gewone papierelectroforese. Ons inziens lijkt het vervolgen van deze immuunglobulinenspiegels dus wel enige indruk te geven van een vóórtdurende immuunsuppressie; aan een enkele bepaling mag men weinig betekenis hechten. B-lymfocyten circuleren in het bloed en hun aantal is in vitro bepaalbaar. Omdat het absolute aantal in het bloed onder normale omstandigheden reeds sterk kan wisselen, lijkt deze bepaling ook geen ideale parameter op te leveren. Men mag aannemen, dat het aantal per mm<sup>3</sup> bloed onvoldoende informatie geeft over de aanwezige capaciteit in vivo. In vitro zijn er verder geen bepalingen mogelijk waarbij vorming van immuunglobulinen kwantitatief goed meetbaar is.

b. ten aanzien van de cellulaire c.q. T-lymfocyt afhankelijke immuniteit:



Omdat T-lymfocyten een primaire rol spelen bij de immuunresponse is onderzoek van deze cellen zonder meer aantrekkelijker.

In vitro is een redelijk betrouwbare telling van het aantal circulerende T-lymfocyten mogelijk. Daarnaast zijn er echter uiteenlopende technieken om juist deze celsoort tot transformatie en deling aan te zetten (stimulatie door immunogenen, aspecifieke mitogenen).

Hierdoor kunnen wij ons redelijk informeren over een statisch (aantal) en een dynamisch (transformatie en deling) aspect.

De cytostatica kunnen door continue toediening de omvang van het lymfoïde apparaat verminderd hebben. Het is verder niet ondenkbaar, dat zij een *functio laesa* te weeg brengen van de nog aanwezige lymfocyten. Dit laatste zou tot uiting kunnen komen in de 'dynamische' in vitro proeven. Op voorhand is het daarom niet onredelijk om aan te nemen, dat dergelijke methodieken een bruikbare parameter voor de immuunsuppressie van het lymfoïde systeem zouden kunnen opleveren.

### 3. ENKELE LITERATUURGEGEVENS OMTRENT DE IMMUNO-SUPPRESSIEVE WERKING VAN DE ANTILEUKEMISCHE THERAPIE

#### *Algemene opmerkingen.*

In paragraaf 2.3.2. werd reeds aangegeven dat o.i. metingen van dynamische aspecten van lymfocyten in vitro een betrouwbare parameter van de immuniteit zouden kunnen opleveren. Alvorens het eigen onderzoek (paragraaf 4) te vermelden, lijkt een bespreking van enkele literatuurgegevens over bepalingen van de immuunstatus tijdens antileukemische therapie nu eerst aan de orde te moeten komen. De oppervlakkige lezer zou kunnen veronderstellen, dat hierover reeds veel uitmuntende en goed doordachte onderzoeken elders hebben plaats gevonden. De literatuur-opgave van het reeds genoemde artikel van Levine c.s. (1974) over infecties tijdens de behandeling van leukemische en lymfoproliferatieve ziekten vermeldt slechts 4 referenties die op metingen van immuunsuppressie betrekking hebben. Met enig zoeken blijken er toch wel meer publicaties te vinden omtrent dit specifieke onderwerp.

Bij deze onderzoeken kan men via het dierexperiment zeker een aantal basale gegevens verzamelen, maar deze gegevens zijn niet direct over te brengen op de situatie bij de mens. De primaire ziekten zijn bij de mens in vele opzichten anders dan experimentele maligne aandoeningen bij het dier. Het is verder ook onaanvaardbaar om normale personen met cytostatica of hoge dosis corticosteroiden te behandelen en zo als controle groep te laten dienen.

Bij de mens zijn er nog de volgende problemen:

1. Men zou de 'immuun-capaciteit' moeten meten vóór het begin van de therapie. Dit is echter maar zeer ten dele mogelijk: tijdelijke stoornissen zijn immers mogelijk door infiltratie van bloed, beenmerg, milt en lymfklieren door maligne cellen. Indien deze onderzoeken een aanzienlijk uitslag van de therapie betekenen, zijn deze niet verantwoord. Anorexie en

gebrekkige eiwitopname, slechte algemene toestand bij het begin van de ziekte hebben onbekend grote invloeden op de immuunresponse.

2. De onderliggende ziekte kan op zich als primair symptoom een vermindering van de immuunresponse met zich meebrengen. Onderzoeken bij de M. Hodgkin of de chronische lymfatische leukemie (C.L.L.) enz. zijn daarom, indien men de immuunsuppressie door antileukemische therapie wil bestuderen, niet bruikbaar. Immers de uitgangswaarde vóór therapie-begins kan reeds afwijkend zijn. Men kan zich zelfs voorstellen, dat ondanks de immuunsuppressie door de therapie bij dergelijke ziekten door teruggaan van de afwijkingen de immuunresponse herstelt!

De fraaie Nederlandse onderzoeken van Sybesma c.s. (1973) omtrent de antistofproductie bij diverse lymfoproliferatieve ziekten en van Bleumink c.s. (1974) omtrent het verloop van de DNCB-huidsensibilisering bij de M. Hodgkin zijn daarom niet relevant in het kader van de bestudering van de iatrogene immuunsuppressie bij de acute leukemie. In deze paragraaf zullen wij ons derhalve beperken tot de bevindingen bij de acute leukemie en daarvan vooral de lymfoblastaire vorm.

### *3.1. Gegevens over de humorale immuniteit c.q. de activiteit van B-lymfocyten.*

In hoofdstuk III werd reeds vermeld, dat de immuunglobulinenspiegels normaal zijn vóór het begin van de therapie bij de acute lymfoblastaire leukemie van het kind. Na de periode van remissie inductie met prednison en één of meerdere cytostatica (methotrexaat, vincristine of 6-mercaptopurine) zijn deze spiegels gedaald, met name neemt het IgG gehalte af (Mc Kelvey en Carbone 1965, Kiran en Gross 1969, Ragab c.s. 1970). Tijdens niet-intensieve onderhoudstherapie (Kiran en Gross 1969, Ragab c.s. 1970) zouden de Ig-spiegels weer redelijk normaal zijn. Freund c.s. (1969) zagen echter daarbij wel geleidelijk een daling optreden van de serum-immuunglobulinenspiegels. Bij intensieve chemotherapie met 2 of 3 cytostatica tegelijk gegeven werd door anderen (Borella en Webster 1971) bij een deel van deze patiënten een daling van de Ig-spiegels, met name van IgG, waargenomen.

Ten aanzien van de antistofproductie na vaccinatie zijn er slechts enkele goede studies: Hersh c.s. (1965) zagen, dat antigenen tijdens een korte fase van intensieve chemotherapie toegediend slechts een uiterst geringe titerstijging lieten zien. Indien de toediening van antigenen plaats vond, direct ná deze cytostatica werd een intermediaire titerstijging waargenomen. Dezelfde auteurs merken in een volgend artikel (Hersh c.s. 1965) op, dat deze immuunsuppressie vooral bij zwakkere antigenen wordt waargenomen.

Ogra c.s. (1971) gingen bij kinderen het verloop na van antistoftiters na een primo- of een boostervaccinatie met geïnactiveerd Salkpoliomyelitis vaccin. Primo-vaccinatie gaf bij gezonde kinderen behoorlijke spiegels van IgM, IgG en soms ook van IgA-antilichamen. Bij de patiënten die behandeld werden voor hun acute lymfoblastaire leukemie waren de verkregen spiegels van IgG en IgA laag tot zeer laag. Een antilichaamstijging van het IgM type bleek echter geheel te ontbreken. Boostervaccinatie gaf bij de patiënten wel een 2-3 voudige verhoging van IgG en IgA antilichamen,

maar een stijging van IgM antilichamen werd niet waargenomen. Dit onderzoek toont echter de typische defecten van veel van deze onderzoeken: het aantal patiënten is klein, zij verkeren in diverse stadia van de ziekte, hebben verschillende soorten therapie.

Een veel zorgvuldiger onderzoek van Borella en Webster (1971) laat echter zien dat vooral de primaire (IgM) maar ook de booster-response (IgG) op een ander immunogeen i.c. het influenzavaccin tijdens intensieve therapie duidelijk verlaagd is. Dit moet geweten worden aan de cytostatica, omdat bij onbehandelde acute leukemie een normale titerstijging zou optreden (Larson c.s. 1953, Silver c.s. 1960, Heath c.s. 1964). Dupuy c.s. (1971) menen op grond van hun waarnemingen, dat ook tijdens de onderhouds-therapie een boostervaccinatie met poliomyelitisvaccin wel een redelijk normale titerstijging te weeg brengt. Ten aanzien van de aantallen B-lymfocyten in het bloed concluderen Sen en Borella (1973), dat dit aantal tijdens een voortgezette therapie sterk daalt, in sterkere mate dan het absolute aantal T-lymfocyten.

Deze gegevens omtrent de humorale c.q. B-lymfocyt afhankelijke immuniteit kan men als volgt samenvatten: de antileukemische therapie leidt bij de acute leukemie tot een daling van de bloedspiegels van immuunglobulinen, deze is meer uitgesproken bij intensievere chemotherapie.

De response op antigenen is onder andere afhankelijk van het eigen immunogene vermogen van deze antigenen. Ten aanzien van immuunsuppressie op een boostervaccinatie lijkt de response ook duidelijk minder verlaagd te zijn dan bij een primo-vaccinatie, althans bij gebruik van influenza of poliomyelitis vaccin. Uit onze eigen onderzoeken (zie later) blijkt, dat boostervaccinaties waarschijnlijk om andere reden onbruikbaar zijn om immuunsuppressie bij de individuele patiënt te meten.

### *3.2. Aspecten van de cellulaire immuniteit, c.q. de activiteit van T-lymfocyten*

#### *3.2.1. Huidtesten met immunogenen*

In het algemeen kunnen deze reacties verminderd zijn, ook tijdens onderhoudstherapie. Wij zelf hebben hierover nooit enig onderzoek verricht. Brun (1971) vermeldt, dat de huidreactie op DNCB duidelijk afneemt o.i.v. stoottherapie met cyclofosfamide (endoxan R) of methotrexaat. Dupuy c.s. (1971) menen, dat de reacties groter en vaker positief zijn tijdens de onderhoudstherapie dan in de floride fase. Hersh c.s. (1974) zagen na de 2de tot 5de maand een afname van de huidreacties op immunogenen, behalve bij die patiënten die langer in remissie bleven.

O.i. is, ook vanwege de betrekkelijke waarde van de gegevens van de individuele patiënt vóór het begin van de therapie, het vervolgen van deze onderzoeken tijdens de voortgezette behandeling weinig zinvol. In de literatuur hebben wij ten deze geen uitgebreide onderzoeken betreffende kinderen aangetroffen. Ook uit grote centra zoals het St. Jude's Children's Research Hospital ontbreken studies, die over dit aspect handelen.

#### *3.2.2. Reacties in vitro van lymfocyten op aspecifieke mitogenen en immunogenen*

Op de vraag in hoeverre bij dergelijke onderzoeken alleen B-lymfocyten

ofwel T-lymfocyten plus een onbekend percentage van de B-lymfocyten worden gestimuleerd, zal hier niet worden ingegaan. Maar ook hier docmt weer het probleem op van het verkrijgen van reële uitgangswaarden vóór het begin van de therapie. Immers, hierbij geldt dat een aantal patiënten tijdens de floride fase van de ziekte moeilijk onderzoekbaar zijn. De lymfocyten worden steeds uit het bloed geïsoleerd, maar in deze fase, bij het begin van de ziekte en ook tijdens een beginnende rechute, is het percentage leukemische cellen in het bloed vaak dermate hoog, dat een zuivere lymfocytensuspensie niet verkrijgbaar en dus niet onderzoekbaar is. Bij een deel van de patiënten is het percentage blasten ongeveer gelijk aan dat van de lymfocyten en is het niet mogelijk na te gaan welke cellen in vitro op stimulatie hebben gereageerd.

Gutterman c.s. (1972) berichten bijv., dat bij acute myeloïde leukemie de prognose beter is als de stimuleerbaarheid van lymfocyten goed is bij het begin van de ziekte.

Omdat echter bij de onbehandelde myeloïde leukemie het percentage leukemische cellen zeer vaak de 100% nadert, is deze bevinding ons inziens van een twijfelachtig gehalte. Ook bij de acute lymfoblastaire leukemie is het bij ongeveer 2/3 van alle patiënten onmogelijk iets over de stimuleerbaarheid van de lymfocyten te zeggen (zie Hoofdstuk VI).

Tijdens de remissie van de acute lymfoblastaire leukemie kan men zich de volgende problemen voorstellen bij de evaluatie van de cellulaire immuniteit.

1. het aantal lymfocyten kan lager zijn dan bij normale controle personen.

2. de verhouding en de absolute aantallen T- en B-lymfocyten kunnen o.i.v. de therapie gewijzigd worden of anders gezegd:

3. de invloed van de antileukemische therapie op de aantallen circulerende T- en B-lymfocyten is waarschijnlijk niet gelijk, wat gezien hun uiteenlopende functies en levensduur in de lijn der verwachtingen is.

Afgezien dus van deze beperkingen zijn er toch wel enkele informatieve en representatieve onderzoeken bekend, omtrent het in vitro gedrag van lymfocyten tijdens de remissie van de acute, meestal lymfoblastaire leukemie.

Hersh en Oppenheim (1967) zagen, dat de in vitro reacties op fytohemagglutinine (PHA) en vaccinia reeds op de 3e dag van intensieve cytostatische kuur aanzienlijk gereduceerd werden. Binnen enkele dagen na het staken van deze therapie werd de reactiviteit van bloedlymfocyten weer normaal. Zij meenden, dat deze reductie te wijten was aan een intrinsieke beschadiging van de lymfocyt en niet aan in het plasma van de patiënt circulerende antimetabolieten. De onderhoudstherapie tijdens de remissie van de acute leukemie en het aantal onderzochte patiënten wordt niet vermeld door Sutherland c.s. (1971); nochtans vermelden zij, dat tijdens de remissie de reactie van bloedlymfocyten op PHA normaal is vergeleken met die van gezonde controles. Lo Curto en Liuzzo (1971) wijzen er op, dat bij hun patiënten tijdens de remissie van hun acute lymfoblastaire leukemie de reactie op PHA bij een deel normaal en bij een ander deel subnormaal was.

Borella en Webster (1971) menen, dat de stimuleerbaarheid door PHA tijdens de remissie van de acute lymfoblastaire leukemie slechts bij 25% verlaagd is

Ook Jones c s (1971) concludeerden uit hun onderzoek, dat de PHA stimulatie tijdens de remissie niet werd beïnvloed door de therapie Wahlen c s (1974) menen echter, dat tijdens de onderhoudstherapie wél een vermindering optreedt, Hersch c s (1974) menen, dat een achteruitgang in PHA-stimulatie samenhangt met een toenemende kans op een rechute van de acute leukemie

Humphrey c s (1972) gebruikten pokeweed mitogeen als stimulans zij bestudeerden dezelfde patienten in remissie van hun acute lymfoblastaire leukemie voor en na intensivering van de therapie (chemotherapie en bestraling van schedel en wervelkolom), ervóór was de reactiviteit van de bloedlymfocyten normaal, maar daarna was deze tijdelijk duidelijk verminderd

De vermelde onderzoeken zijn moeilijk onderling vergelijkbaar, daarvoor zijn de onderzochte patientengroepen te heterogeen Bovendien zijn er uiteenlopende manieren waarop de PHA-stimulatie wordt berekend Op deze problematiek zal bij de bespreking naar aanleiding van het eigen onderzoek worden teruggekomen

#### 4 EIGEN ONDERZOEK

De primaire opzet van onze onderzoeken is niet zozeer geweest om immuunsuppressie door antileukemische therapie aan te tonen, dat zoiets in wisselende mate teweeg wordt gebracht is genoegzaam bekend De hoop is er steeds op gericht geweest om bij de individuele patient iets te kunnen zeggen over de mate van immuunsuppressie Zoals er grote individuele verschillen bestaan in de gevoeligheid van erythropoiese, granulocytopoiese, haargroei, mondepitheel enz van patient tot patient is een dergelijke variabiliteit ten aanzien van immuunsuppressie even goed te verwachten Indien men de mate van immuunsuppressie beter kent, zal men de individuele patient beter kunnen behandelen en op zich is individualisering van de therapie, uiteraard op goede gronden, altijd aantrekkelijker dan een volkomen gelijkvormige behandeling Ten aanzien van de optimalisering van de therapie van de individuele patient zijn wij niet in onze opzet geslaagd Anderzijds is ons hieruit gebleken, dat de individuele variabiliteit uitermate groot is

Bovendien blijkt, dat ook normale personen onderling zeer wisselend en niet uniform op dezelfde immunologische prikkel reageren

Het eigen onderzoek valt uiteen in drie delen

4.1 Het verloop van de PHA-stimulatie van lymfocyten tijdens de onderhoudstherapie en tijdens consolidatie kuren volgens Mathé c s (1967)

4.2 Het verloop van de antilichaamtiteren en de in vitro stimulatie van bloedlymfocyten door antigenen na boostervaccinatie met DTP-vaccin

4.3 Het verloop van de in vitro stimulatie van lymfocyten op aspecifieke mitogenen, 'memory'-antigenen en een constant aanwezig antigeen tijdens consolidatie en onderhoudstherapie volgens protocol A L L - 2 - 1973

N W I K

#### 4.1 Het verloop van de PHA stimulatie van lymfocyten tijdens onderhouds-therapie en consolidatiekuren volgens Mathé c.s. (1967)

Het nu te beschrijven onderzoek is reeds eerder gepubliceerd (Bakkeren c.s. 1972). Ten tijde van dit onderzoek werd de PHA stimulatie van bloed-lymfocyten beschouwd als een goede graadmeter van de zogenaamde 'cell-mediated' of T-lymfocyt afhankelijke immuniteit. Sindsdien is deze opvatting in vele opzichten gewijzigd en mag men slechts zeggen, dat bij een normale T-lymfocytenfunctie, in het algemeen gesproken, de PHA-stimulatie zeker normaal moet zijn.

##### 4.1.1. Patienten

Dit waren allen kinderen, die in de eerste complete remissie verkeerden van hun acute lymfoblastaire leukemie. De remissie was geïnduceerd volgens de methode beschreven door Mathé c.s. (1967) met rubidomycine, vincristine en een hoge dosis prednison 1 dd. of met een combinatie van L-asparaginase en prednison (de Vaan c.s. 1971). In die gevallen was het immuunsuppressieve L-asparaginase altijd meer dan 2 maanden gestopt ten tijde van het onderzoek; de algemene toestand van de onderzochte patienten was altijd bevestigd door een recent (enkele dagen ervoor) beenmerg-onderzoek.

##### 4.1.2. Antileukemische therapie tijdens de remissie

Alle patienten kregen cyclisch één middel. 6-mercaptopurine 2,5-3 mg/kg lichaamsgewicht, methotrexaat 2 x per week 20 mg/m<sup>2</sup> en cyclofosfamide 2,5-3 mg/kg. Elk middel werd 1 dd. gedurende 6-8 weken gegeven en elke periode werd onderbroken door een zogenaamde consolidatiekuur, bestaande uit rubidomycine 1 dd. 20 mg/m<sup>2</sup> op twee achtereenvolgende dagen, de eerste maal in combinatie met vincristine 1,5 mg/m<sup>2</sup> en verder 1 dd. 50 mg/m<sup>2</sup> prednison gedurende een week. Deze onderhouds- en consolidatie therapie is gebaseerd op het schema van Mathé c.s. (1967), de algemene toestand bleek hierbij goed te blijven. Terloops zij opgemerkt, dat ook na jarenlang voortgezette therapie het rubidomycine volgens onze ervaringen, bij deze kinderen nauwelijks cardiotoxisch is gebleken.

##### 4.1.3. Tijdstippen van het onderzoek

*a ten aanzien van de onderhoudstherapie* de medicatie werd toegediend tussen 7.00 en 8.00 uur 's ochtends, de bloedafname vond plaats tussen 9.00 en 9.30 uur.

*b ten aanzien van de consolidatiekuur:* het bloed werd afgenomen vlak vóór het begin van de kuur en vervolgens nog eenmaal op de 4e (soms 3e) dag van de kuur.

##### 4.1.4. Onderzoeksmethode

Uit het bloed werd een lymfocytenrijke suspensie bereid, die met PHA werd geïncubeerd. De stimulatie werd gekwantificeerd door middel van het nagaan van de incorporatie van <sup>3</sup>H-thymidine na 72 uur kweken van de lymfocyten. De resultaten zijn steeds uitgedrukt in cpm/500.000 lymfo-

cyten Voor een gedetailleerde beschrijving zij verwezen naar het Hoofdstuk VII 'methodieken'.

#### 4.1.5. Resultaten

Deze zijn uiteraard vergeleken met de resultaten van PHA stimulatie verkregen bij normale kinderen die geen enkele vorm van therapie kregen (tabel V-1).

TABEL V-1 PHA-stimulatie bij normale kinderen

Controles	cpm/500 000 lymfocyten			
1	35 000	—	—	—
2	60 200			
3	28 300			
4	42 100			
5	34 720			
6	52 200			
7	29 450			
8	41 510			
9	42 200			
10	80 500			
11	72 800			
12	41 000			
13	70 030			
14	53 500			
15	50 700			

Gemiddelde  $\pm$  S D 48 950  $\pm$  4 100

#### a. Tijdens onderhoudstherapie

De stimulatie tijdens onderhoudstherapie (tabel V-2) bleek in grote lijnen normaal te zijn, hoewel mogelijk de stimulatie onder 6-mercaptopurine-therapie wat lager is. Het aantal waarnemingen (5) is achteraf gezien ech-

TABEL V-2 PHA-stimulatie tijdens onderhoudstherapie met één cytostaticum in cpm/500 000 lymfocyten

6 mercaptopurine *		methotrexaat*		cyclofosfamide *	
patient	cpm	patient	cpm	patient	cpm
1	29 600	1	96 800	1	55 000
2	44 500	2	67 440	2	34 200
3	50 400	3	38 810	3	85 200
4	31 900	4	33 100	4	51 500
5	29 450	5	82 060	5	44 900
		6	58 350		
		7	33 600		
		8	24 630		
gemiddelde $\pm$ S D					
	37 170 <sup>1</sup>		54 160 <sup>1</sup>		48 950 <sup>1</sup>
	$\pm$ 4 320		$\pm$ 8 500		$\pm$ 4 100

\* doseringen zie tekst

<sup>1</sup> Gemiddelde  $\pm$  S D van 15 normale kinderen 48 950  $\pm$  4 100

ter niet groot, helaas waren wij beperkt doordat er niet meer patiënten beschikbaar waren. Voorzover het geoorloofd is conclusies te trekken lijkt het, dat de PHA stimulatie door dit cytostaticum, in deze dosering, niet wordt beïnvloed. Tijdens de therapie met methotrexaat of cyclofosfamide, resp. 8 en 5 waarnemingen, blijken de waarden verkregen na stimulatie met PHA niet veel af te wijken van de waarden gevonden bij de controles. Uit de gegevens van de controles blijkt de spreiding van deze waarden ook bij normale kinderen echter reeds vrij groot te zijn. De exacte uitslagen van de waarnemingen zijn weergegeven in tabel V-1 en V-2.

#### b. vóór en tijdens consolidatiekuur

In de hier gebruikte consolidatiekuren met rubidomycine, vincristine en prednison hebben de eerstgenoemde middelen zonder twijfel een sterk cytostatische werking. Het prednison werkt daarentegen niet cytostatisch, het lijkt zelfs in staat te zijn om het beenmerg tot proliferatie aan te zetten. Van dit laatste middel is echter een negatieve werking op het lymfocytenaantal en hun functie *a priori* wel te verwachten c.q. niet onmogelijk te achten.

Het onderzoek naar het effect van deze gelijktijdig toegediende, ten dele tegenstrijdig werkende middelen, is op zich niet direct aantrekkelijk te noemen. Deze combinaties zijn echter bij de acute lymfoblastaire leukemie therapeutisch werkzaam, voor de clinicus is daarom onderzoek naar het resulterende effect toch verantwoord te achten.

In tabel V-3 zijn de resultaten van de PHA stimulatie voor en tijdens deze

TABEL V-3 PHA-stimulatie vóór en tijdens consolidatietherapie\*, vergeleken met normale controles in cpm/500.000 lymfocyten.

patiënt	vóór	tijdens	I.R. <sup>1</sup>	controle	1e proef	2e proef	I.R. <sup>2</sup>
1	154.100	10.280	0,07	1	50.700	70.029	1,38
2	51.600	15.210	0,29	2	53.500	41.000	0,77
3	58.600	57.200	0,98	3	72.800	80.500	1,17
4	73.270	135.928	1,85	4	42.200	41.510	0,98
5	52.800	95.610	1,81	5	9.910	2.200	0,22
6	18.520	9.630	0,57	6	7.920	18.690	2,36
7	187.300	3.910	0,02	7	29.450	34.720	1,18
8	29.600	10.090	0,34	8	52.200	42.100	0,81
9	67.400	1.730	0,03	9	32.600	36.500	1,12
10	12.120	5.850	0,48	10	26.700	35.800	1,34
11	38.810	17.340	0,45	11	33.000	10.680	0,32
12	33.100	15.710	0,48	12	10.210	6.550	0,64
13	34.200	1.590	0,05	13	5.660	3.050	0,54
14	82.060	6.590	0,08	14	28.300	36.380	1,28
15	34.960	18.940	0,54				
16	49.900	54.000	1,08				
17	44.500	31.550	0,71				
	gemiddelde $\pm$ S.D.:		0,58		gemiddelde $\pm$ S.D.:		1,01
			( $\pm 0,14$ )				( $\pm 0,14$ )

\* Doseringen: zie tekst (paragraaf 4.1.2.)

<sup>1</sup> I.R. = incorporatieratio : cpm tijdens consolidatie gedeeld door cpm vóór deze kuur

<sup>2</sup> I.R. = idem : cpm van 2de proef gedeeld door cpm 1e proef



consolidatiekuur vermeld (17 waarnemingen). Bij 14 controles, allen kinderen met dezelfde leeftijdsverdeling, werden twee kweken ingezet met een interval van 3 dagen. Opvallend zijn de zeer hoge waarden van de PHA stimulatie bij het begin van de kuur bij patiënten 1 en 7. Of het feit, dat dit 2 kinderen betreft, die tijdens de eerste remissie zijn overleden aan resp. een waterpokken en een mazeleninfectie, verband houdt met deze uitzonderlijk hoge stimuleerbaarheid is onbekend. In het algemeen gesproken vindt men bij de kweek tijdens de kuur een duidelijke verlaging van de reactie op PHA.

Uit tabel V-4 waarin het effect op het absolute aantal lymfocyten wordt weergegeven van de consolidatiekuur, blijkt bij 18 waarnemingen, dit aantal steeds te zijn afgenomen, de afname bedraagt 14-94% van de uitgangswaarde. Zelfs indien deze afname ten dele zou berusten op verplaatsing van het bloed naar andere compartimenten, zou dit een aanzienlijke reductie van het totale aantal lymfocyten in het lichaam kunnen betekenen. Uit deze resultaten zou men dus kunnen vermoeden, dat deze vorm van consolidatiekuur een tijdelijke vermindering van de omvang van, een deel?, van het lymfoïde apparaat geeft, te samen met een functio laesa van de in het bloed circulerende lymfocyten.

TABEL V-4 *Het effect van de consolidatietherapie\* op het lymfocyten aantal in het perifere bloed.*

Patiënten	lymfocyten/mm <sup>3</sup> vóór therapie	lymfocyten/mm <sup>3</sup> tijdens therapie	Percentage afname
1	1.770	460	74
2	1.010	510	50
3	1.170	660	44
4	1.410	700	50
5	2.060	120	94
6	2.720	450	83
7	3.420	1.030	70
8	770	660	14
9	580	120	79
10	1.910	370	81
11	3.570	950	73
12	1.480	390	74
13	2.700	670	75
14	1.950	600	69
15	1.600	310	81
16	2.270	390	83
17	1.500	360	76
18	1.730	660	62
gemiddelde $\pm$ S.D.: 69 ( $\pm$ 14)			

\* Doseringen: zie tekst (paragraaf 4.2.1.)

#### 4.2. *Het verloop van de antilichaamtiteren en de in vitro stimulatie van bloed-lymfocyten door antigenen na booster vaccinatie met D.T.P. vaccin.*

##### 4.2.1. *Vraagstelling*

Het is zeker niet onredelijk om te stellen, dat voor een optimaal verloop

van de reactie op vele immunogenen de T-lymfocyten de eerste en belangrijkste rol spelen (zie paragraaf 2.3.1.) Nochtans is voor een optimaal functionerende immuniteit een normale B-lymfocytenactiviteit en derhalve een normale antilichamenproductie eveneens een vereiste.

Een geslaagde boostervaccinatie is slechts mogelijk indien het immunologisch geheugen intact is; in hoeverre dit geheugen verdeeld is over T- en B-lymfocyten wordt bij deze constatering in het midden gelaten. Cytostatica zouden kunnen interfereren met de levensduur van deze geheugencellen (Rowley c.s. 1969); de reactie in vitro van bloedlymfocyten op bijvoorbeeld *Candida albicans* zou onder een dergelijke therapie vermindern (Folb en Trounce 1970).

De boostervaccinatie zal een deel, namelijk de reeds gesensibiliseerde lymfocyten tot eiwit- en nucleïnezuur-synthese, transformatie en mitose kunnen brengen. Naast activering van gesensibiliseerde lymfocyten, vindt ook recrutering van niet-gesensibiliseerde lymfocyten plaats. Verder zal in vivo de antilichaamproductie tijdelijk worden verhoogd.

De boostervaccinatie houdt dus in: de aanwezigheid van het immunologisch geheugen ten aanzien van de booster, een reactie van B-lymfocyten en tenslotte ook een reactie van plasmacellen, zich uitend in specifieke antilichaamsynthese. Al deze processen kunnen door de antileukemische therapie worden verstoord.

Deze overwegingen brachten ons ertoe het effect na te gaan van een boostervaccinatie met DTP-vaccin. De keuze van dit vaccin berustte op de navolgende overwegingen:

1. Vrijwel alle kinderen zijn voor het begin van de ziekte gevaccineerd met DKTP.

2. De tijdstippen van deze entingen zijn bekend, door middel van 'vaccinatieboekjes'.

3. DTP-vaccinatie is volkomen onschuldig, het bevat geen levende substantie waarop een eventueel abnormale immunologische reactie kan plaatsvinden.

4. Deze vaccinatie kan altijd herhaald worden.

Alvorens dit onderzoek bij patiënten te doen, werd uiteraard eerst een onderzoek bij gezonde personen verricht. De in vitro reactie met het ter onzer beschikking staande poliomyelitis-antigeen bleek in ons laboratorium een te geringe stimulatie van de lymfocyten op te leveren. Daarom werd de in vitro stimulatie alleen uitgevoerd met het difterie- en het tetanustoxoid. In tegenstelling tot sommige onderzoekers werd hiervoor geen 'cocktail' gebruikt, maar de reactie van elk afzonderlijk immunogeen nagegaan.

Vóór en op verschillende tijdstippen (3 en 6 weken) na een boostervaccinatie werd nagegaan:

1. de reactie in vitro van bloedlymfocyten op difterietoxoid en tetanustoxoid.

2. de antilichaamtiteren gericht tegen deze twee immunogenen.

Het opzetten van de technieken voor de in vitro bepaling bleek zeer tijdrovend te zijn. Wij zijn er niet in geslaagd om deze methode van

de booster vaccinatie met DTP bij patiënten met vrucht te gebruiken. Omdat de resultaten van het vooronderzoek echter geheel onverwacht waren, lijkt een vermelding in dit hoofdstuk toch wel gerechtvaardigd.

#### 4 2.2. Methoden

Voor een gedetailleerde beschrijving zie Hoofdstuk VII 'Methodieken'.

#### 4.2.3. Resultaten

Uit tabel V-5 blijkt, dat bij normale, gevaccineerde kinderen zonder recente boostervaccinatie de lymfocyten in vitro stimuleerbaar zijn voor deze twee immunogenen. De resultaten van deze stimulatie zijn ook reproduceerbaar: dit werd bij slechts een normale volwassene op 3 tijdstippen met intervallen van 3-5 dagen nagegaan (tabel V-6). Bij nog niet gevaccineerde zuigelingen werd nagegaan of deze immunogenen als aspecifieke mitogenen werkzaam kunnen zijn. De verschillen in <sup>3</sup>H-thymidine-incorporatie tussen de celkweek met het immunogeen en de controlekweek zijn nihil of in ieder geval veel geringer dan de verschillen bij gevaccineerden (tabel V-5 en 6 versus tabel V-7). Uit deze gegevens mag

TABEL V-5 Stimulatie in vitro van bloedlymfocyten met antigenen en antilichaamtiters bij normale gevaccineerde kinderen

		Stimulatie in cpm		antilichaamtiter/ml		
leeftijd <sup>1</sup>		difterie toxoid	tetanus toxoid	blanco	difterie toxoid	tetanus toxoid
1	2,6	25 060	22 600	720	0,125	320
2	3,0	26 360	45 170	1 330	0,125	n b
3	3,3	1 160	2 410	800	> 1,4	2 560
4	3,6	24 590	10 600	930	0,25	2 560
5	5,0	4 110	32 490	1 570	0,35	10 240
6	5,6	11 500	39 100	490	0,125	2 560
7	5,6	4 770	17 660	1 130	0,5	5 120
8	6,6	18 640	57 820	620	0,09	2 560
9	8,6	710	23 720	570	0,09	5 120
10	9,0	36 500	31 750	1 790	0,5	1 280
11	11,0	54 570	67 830	930	n b	n b
12	11,4	50 400	43 870	1 570	0,70	6 400
13	11,9	14 400	14 050	1 250	0,5	2 560
14	12,6	650	2 280	390	0,125	1 280

<sup>1</sup> Verklaring: leeftijd in jaren, maanden

TABEL V-6 Stimulatie in vitro van bloedlymfocyten met antigenen bij een normale volwassene met intervallen van 3-5 dagen cpm/ml kweek

Bepaling	1	2	3
difterietoxoid	18 280	17 060	25 000
tetanustoxoid	11 930	8 620	11 700
blanco	2 230	1 530	940

Gemiddeld + S D

difterietoxoid 20 110 (± 2 470) cpm

tetanustoxoid 10 750 (± 1 070)

men concluderen, dat de aspecifieke activiteit van de onderzochte immunogenen gering of ontbrekend is.

TABII V-7 *Stimulatie in vitro van bloedlymfocyten met antigenen en antilichaamtiteren bij normale ongevaccineerde zuigelingen.*

Leeftijd in weken		cpm/ml kweek			antilichaamtiters/ml	
		difterie- toxoid	tetanus- toxoid	blanco	difterie- toxoid	tetanus- toxoid
1	2	790	1.180	260	>1,4	1.280
2	7	4.800	6.690	2.920	<0,005	0
3	8	n.b.	6.970	3.250	n.b.	n.b.
4	8	3.890	3.400	3.300	n.b.	n.b.
5	10	560	n.b.	420	<0,005	0
6	10	n.b.	350	340	<0,005	0

Na deze vooronderzoeken werd bij 8 volwassenen en bij 4 kinderen een boostervaccinatie verricht (tabellen V-8 en V-9). Vóór en op diverse tijdstippen na de boostervaccinatie werden vier waarnemingen per keer gedaan: twee in vitro-stimulaties met resp. difterie- en tetanustoxoid en twee antilichaam-titer bepalingen tegen deze twee immunogenen.

TABII V-8 *Stimulatie in vitro van bloedlymfocyten met antigenen en antilichaamtiteren bij normale volwassenen Vóór, 3 en 6 weken na vaccinatie met DTP*

gebruikt mitogeen	stimulatie in cpm/ml			antilichaamtiteren/ml		
	vóór	3 wkn na DTP	6 wkn na DTP	vóór	3 wkn na DTP	6 wkn na DTP
1. difterie toxoid	990	990	3.320	n.b.	<0,01	<0,01
tetanus toxoid	12.040	3.460	29.400	n.b.	3.200	5.120
blanco	680	920	2.050			
2. difterie toxoid	3.410	3.120	3.310	n.b.	<0,01	0,70
tetanus toxoid	16.200	16.800	11.620	n.b.	5.120	3.200
blanco	2.100	1.260	1.590			
3. difterie toxoid	n.b.	1.940	3.910	0,09	<0,01	1,40
tetanus toxoid	n.b.	5.220	18.460	20.480	5.120	12.800
blanco	n.b.	710	1.230			
4. difterie toxoid	n.b.	n.b.	13.440	0,01	n.b.	>5,60
tetanus toxoid	n.b.	n.b.	9.020	0	n.b.	n.b.
blanco	n.b.	n.b.	2.890			
5. difterie toxoid	12.150	26.400	23.000	<0,01	>5,60	>5,60
tetanus toxoid	8.650	40.200	8.450	160	32.000	51.200
blanco	1.810	790	1.210			
6. difterie toxoid	12.750	13.150	21.900	1,40	2,00	n.b.
tetanus toxoid	11.540	8.030	30.900	2.560	5.120	6.400
blanco	1.440	2.660	1.670			
7. difterie toxoid	15.610	10.360	5.590	0,59	1,40	2,0
tetanus toxoid	6.890	23.500	9.300	640	5.120	n.b.
blanco	600	4.450	1.400			
8. difterie toxoid	7.400	26.800	7.030	1,40	4,00	>2,80
tetanus toxoid	19.340	69.700	20.500	640	5.120	5.120
blanco	2.080	2.760	1.220			

TABII V-9 Stimulatie *in vitro* van bloedlymfocyten door antigenen en antilichaamtiteren bij normale kinderen

Gebruikt mitogeen	stimulatie in cpm/ml		antilichaamtiteren/ml	
	voor	4 weken na DTP	voor	4 weken na DTP
1 difterie toxoid	10 950	23 470	0,25 - 0,125	>1,4
tetanus toxoid	38 480	21 280	5 120	20 480
blanco	1 780	6 230		
2 difterie toxoid	2 510	10 830	0,18 - 0,25	>1,4
tetanus toxoid	37 060	18 110	3 200	25 600
blanco	2 480	2 690		
3 difterie toxoid	8 930	20 200	0,015 - 0,06	>1,4
tetanus toxoid	18 080	41 840	2 560	20 480
blanco	1 210	560		
4 difterie toxoid	7 500	13 310	0,09 - 0,125	>1,4
tetanus toxoid	16 720	47 480	2 560	25 600
blanco	2 080	1 650		

Wanneer men deze tabellen V-8 en V-9 nauwkeurig beziet, moet men het volgende concluderen

- 1 de titerstijging is bij de kinderen voor beide immunogenen na 4 weken steeds aanwezig,
- 2 de titerstijging bij de volwassenen vertoont een zeer wisselend beeld,
- 3 de mate van stimulatie door de gebruikte immunogenen is voor en na boostervaccinatie zeer wisselend

4 correlaties tussen de vier waarnemingen onderling en tussen de waarnemingen en de tijdstippen van het onderzoek lijken te ontbreken

Het is duidelijk, dat uit deze bevindingen slechts blijkt, dat het toepassen van de boostervaccinatie en deze vier parameters van het effect, voor metingen van immuunsuppressie weinig of geen zin hebben

Het ontbreken van elke onderlinge correlatie was voor ons een onverwachte bevinding. Hierop zal in de discussie worden teruggekomen

#### 4.3 Het verloop van de *in vitro* stimulatie van lymfocyten op aspecifieke mitogenen, 'memory'-antigenen en een constant aanwezig antigeen tijdens consolidatie en onderhoudstherapie volgens protocol A L L -2-1973 N W L K

##### 4.3.1 Vraagstelling

Uit de onderzoeken vermeld onder 4.1 was gebleken, dat PHA stimulatie tijdens de consolidatietherapie duidelijk verminderd was. Verder bleek daaruit, dat een weinig intensieve cytostatische therapie weinig invloed had op het resultaat van de PHA-stimulatie. Uit het onderzoek vermeld onder 4.2 kwam naar voren dat, althans bij kinderen, het geheugen aan de voorgaande vaccinaties jarenlang blijft bestaan.

De kliniek leert ons, dat tijdens antileukemische therapie infecties met normaal weinig pathogene micro-organismen zeer ernstig kunnen verlopen (Zie Hoofdstuk IV, Hoofdstuk V, paragraaf 1).

Deze overwegingen brachten ons ertoe om op een andere wijze te trachten de immuunsuppressie te meten en wel door de lymfocyten gelijktijdig op 5 verschillende wijzen te onderzoeken. Het zou immers kunnen zijn, dat

iedere wijze op een verschillende manier en verschillend in ernst of omvang door de therapie beïnvloed kon zijn. Opnieuw moest men zich dan afvragen of de invloed van de zogenaamde consolidatietherapie, waarbij onder andere prednison wordt toegediend en van de zogenaamde onderhoudstherapie, waarbij alleen echte cytostatica worden gegeven, dezelfde zou zijn.

De keuze van de mitogenen werd daarom als volgt gemaakt:

a. specifieke mitogenen. Omdat gebruik van PHA alléén mogelijk te weinig informatie zou bieden, werd naast dit mitogeen ook het zogenaamde pokeweed mitogeen (PWM) gebruikt.

b. als 'memory'-antigenen werden het gezuiverde difterie- en tetanus-toxoid gebruikt.

c. tenslotte werd ook het *Candida albicans* als antigeen gebruikt. Onder normale omstandigheden is dit steeds aanwezig, maar is het nauwelijks pathogeen te noemen voor gezonde kinderen en volwassenen.

#### 4.3.2. Proefopstelling

##### a. Therapie

De tijden veranderen en met hen niet alleen de zeden, maar ook de therapieën.

De patiënten, allen kinderen verkerende in een eerste remissie van een acute lymfoblastaire leukemie, waren allen in remissie gebracht volgens het therapieschema van het reeds genoemde protocol. De geslaagde remissie inductie poging werd dan gevolgd door een 'centraal zenuwstelsel leukemie' profylaxe, waarbij het ruggemerg niet wordt bestraald. Na de remissie-inductie volgt een 5-weekse periode met onderhoudstherapie. Daarna werd continu doorgegaan met:

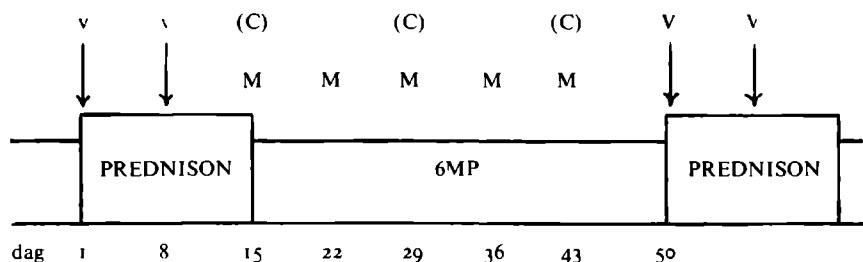
a. consolidatietherapie: 1 dd. 40 mg prednison/m<sup>2</sup> gedurende 14 dagen. Op dag 1 en 8 van deze periode wordt vincristine i.v. toegediend in een dosis van 2 mg/m<sup>2</sup> per keer.

b. onderhoudstherapie: gedurende 5 weken (dag 15 t/m dag 49) bestaande uit: 1 dd. 50 mg 6-mercaptopurine/m<sup>2</sup> p.o., 1/week 30 mg methotrexaat/m<sup>2</sup> p.o. op dag 15, 22, 29, 36 en 43. Een deel van de kinderen krijgt bovendien 1/2 weken 200 mg cyclofosfamide/m<sup>2</sup> p.o. op dag 15, 29 en 43.

##### b. Tijdstippen van het onderzoek

Om zowel het effect van de onderhouds- als van de consolidatietherapie na te gaan, werd gekozen voor de volgende tijdstippen: dag 1, 15, 22, 36 en 50. Het bloed werd afgenomen in de ochtend vóórdat de patiënt de medicatie van die dag kreeg toegediend. (zie figuur V-1).

Om de vergelijkbaarheid van de te vinden gegevens groter te maken, werd het onderzoek begonnen op een vast tijdstip van het ziekteverloop nl. 11 à 12 weken na het begin van de therapie. Dit i.t.t. het onderzoek sub. 4.1., waarbij de remissieduur 2 tot 30 maanden bedroeg ten tijde van het onderzoek.



V = vincristine 2 mg/m<sup>2</sup> i v M = methotrexaat 30 mg/m<sup>2</sup> p o (C) = cyclophosphamide 200 mg/m<sup>2</sup> p o 6 MP = 6-mercaptopurine 50 mg/m<sup>2</sup> p o Prednison 40 mg/m<sup>2</sup> i dd

Alle doseringen i dd 's ochtends, M+6MP = schema A, M+6MP+CPA = schema B  
Alles volgens protocol N W L K 1973-2-A L L

TABEL V-10 PHA en PWM-stimulatie<sup>1</sup> tijdens consolidatie- en onderhoudstherapie volgens protocol A L L -2-1973 schema A/B\* N W L K

Patient	leeftijd geslacht	A/B*	dag 1	dag 15	dag 22	dag 36	dag 50
1	1,10 M	A	60 900 <sup>2</sup>	7 830	17 860	57 670	88 500
			2	-	-	12 900	-
2	3,4 V	A	33 400	7 580	31 190	28 900	37 120
			14 470	1 570	6 460	5 850	14 320
3	3,6 M	A	24 960	34 860	18 840	-	69 160
			-	9 810	-	-	-
4	3,8 V	A	52 270	69 630	106 110	38 480	59 130
			4 590	4 060	28 420	8 570	13 600
5	3,9 V	A	30 760	68 310	38 480	20 030	-
			2 200	910	-	-	-
6	3,11 V	B	21 540	23 050	37 710	3 820	-
			3 800	4 180	-	7 400	7 460
7	4,4 V	A	51 660	62 180	-	-	-
			-	-	-	-	-
8	5,9 V	B	78 040	72 890	32 820	-	41 350
			3 220	12 800	-	-	4 910
9	10,1 V	B	23 810	35 180	26 410	13 180	10 670
			1 360	1 420	4 160	6 270	-
10	10,2 M	B	49 350	44 510	49 220	78 050	75 370
			-	-	-	-	-
11	10,3 M	A	22 390	14 530	36 590	33 880	32 700
			2 240	-	3 700	3 320	2 170
12	15 M	A	20 200	41 400	50 550	27 580	-
			-	-	-	6 390	-

**Verklaring**

<sup>1</sup> uitgedrukt in cpm/500 000 lymfocyten met PHA resp PWM

<sup>2</sup> de bovenste rij PHA, de tweede rij PWM

\* A onderhoudstherapie zonder cyclofosfamide

B onderhoudstherapie met cyclofosfamide

#### 4.3.3. Methodieken

Hiervoor wordt verwezen naar Hoofdstuk VII Methodieken.

#### 4.3.4. Resultaten

Op de dagen van het onderzoek werden dus 5 in vitro kweken ingezet, bovendien werd onder andere het absolute aantal lymfocyten/mm<sup>3</sup> bepaald. Dit zijn per patiënt, per keer 6 gegevens. Omwille van de overzichtelijkheid zijn deze in 3 tabellen vermeld. Bij een aantal vooral jongere kinderen bleek het te belastend te zijn om elke keer voldoende lymfocyten c.q. bloed af te nemen voor alle bepalingen. Om dezelfde redenen werd zelfs bij een aantal kinderen op voorhand afgezien van dit voor hen niet onmiddellijk relevante onderzoek. De resultaten zullen als volgt worden beschreven:

- a. resultaten van stimulatie met aspecifieke mitogenen (tabel V-10).
- b. resultaten van stimulatie met antigenen c.q. immunogenen (tabel V-11).

- c. verloop van de aantallen leucocyten en lymfocyten/mm<sup>3</sup> tijdens consolidatie en onderhoudstherapie (tabel V-12).

- d. PHA en PWM stimulatie vóór het begin van de remissie-inductie en bij het begin van de 1ste consolidatiekuur.

Op elke tabel wordt dezelfde patiënt door hetzelfde nummer aangegeven.

- a. ad tabel V-10: de resultaten lijken geen vast patroon te vertonen: tijdens de onderhoudstherapie (kweken van dag 15 t/m 50) worden stijgingen en dalingen waargenomen van zowel de PHA als van de PWM stimulatie. Na 14 dagen therapie met dagelijks prednison werd slechts in 2 van de 12 gevallen een daling van de stimulatie door aspecifieke mitogenen gezien. Dit beeld is dus geheel anders dan de resultaten vermeld onder 4.1., waar bij tijdens de consolidatie een daling regelmatig gezien werd. Stimulatie met PWM werd niet steeds uitgevoerd, maar de gegevens overziend lijkt dit geen ander patroon te hebben c.q. geen nieuwe gezichtspunten op te leveren.

- b. ad tabel V-11: stimulatie door antigenen. Ook hier valt weer op het weinig consistente verloop van de gevonden waarden in deze 7 weekse periode van het onderzoek. Er lijkt geen correlatie te zijn tussen de bevindingen van de 3 antigenen onderling noch tussen de bevindingen van de consolidatie-periode (kweken van dag 1 en 15) en van de 'onderhoudstherapie-periode' (kweken dag 15, 22, 36 en 50).

- c. ad tabel V-12: verloop van totaal aantal leucocyten en het absolute aantal lymfocyten.

Met enig genoegen kunnen wij deze tabel tonen: zeer duidelijk is daar bij alle patiënten te zien, dat het aantal lymfocyten tijdens de prednison therapie, soms zeer uitgesproken zelfs, toeneemt, om tijdens de onderhoudstherapie weer te dalen. Bij de patiënten die óók cyclofosfamide krijgen is dit laatste mogelijk nog opvallender.

- d. ad tabel V-13: vergelijking van stimulatie vóór het begin van alle therapie en bij het begin van de eerste consolidatiekuur.

In het kader van ons onderzoek naar immunologische kenmerken van lym-



TABII V-11 Stimulatie door antigenen tijdens consolidatie- en onderhoudstherapie cpm/  
2 000 000 leucocyten

Patient	leeftijd geslacht	sche- ma A/B*	dag 1	dag 15	dag 22	dag 36	dag 50
1	M 1,10	A	1 390 <sup>1</sup>	—	630	150	1 480
			2 510 <sup>2</sup>	—	21 270	760	—
			2 510 <sup>3</sup>	—	380	180	1 320
			9 010 <sup>4</sup>	—	9 450	1 850	6 320
2	V 3,4	A	12 630	410	470	270	—
			—	150	390	160	—
			—	—	420	260	—
			42 890	340	820	3 130	—
3	M 3,6	A	700	—	420	—	3 610
			2 590	—	410	—	9 970
			—	—	—	—	—
			1 120	—	940	—	—
4	V 3,8	A	1 290	2 110	3 660	520	1 440
			920	4 160	3 830	180	430
			—	43 120	28 330	11 960	60 390
			31 180	31 200	14 780	29 700	66 850
5	V 3,9	A	2 070	490	590	580	—
			7 960	820	—	18 090	—
			2 390	430	1 360	560	—
			12 050	390	14 740	11 700	—
6	V 3,11	B	750	210	—	380	600
			960	120	—	120	170
			900	150	—	300	630
			3 310	350	—	920	3 130
7	V 4,11	A	680	—	2 040	—	—
			3 150	—	26 100	—	—
			—	—	—	—	—
			3 780	—	—	—	—
8	V 5,9	B	190	2 570	910	—	660
			90	3 160	—	—	3 370
			220	3 340	900	—	670
			170	4 370	1 120	—	530
9	V 10,1	B	760	780	600	310	270
			67 310	27 920	34 300	42 490	8 540
			16 850	2 590	2 760	4 300	—
			58 490	4 100	20 760	21 790	—
10	M 10,2	B	—	1 940	340	—	—
			—	62 060	2 290	—	—
			—	3 460	—	—	—
			—	7 700	2 440	—	—
11	M 10,3	A	620	3 380	1 140	920	470
			320	68 590	43 040	19 020	13 160
			1 870	8 460	5 150	2 770	1 880
			16 620	21 620	26 560	30 020	27 920
12	M 15	A	3 060	720	350	580	1 810
			28 260	83 740	32 410	6 780	53 030
			—	13 340	7 960	—	20 570
			—	11 320	16 760	—	57 510

Gebruikte mitogenen 1 geen, 2 candida albicans, 3 difteriëtoxoid, 4 tetanustoxoid

\* A/B = onderhoudstherapie zonder/met cyclofosfamide

TABEL 12 Totaal aantal leucocyten en aantal lymfocyten/mm<sup>3</sup> tijdens consolidatiekuur en onderhoudstherapie volgens protocol N W I K A L L -2 1973

Patient	leeftijd geslacht	sche- ma A/B	dag 1	dag 15	dag 22	dag 36	dag 50
1	M 1,10	A	4 300 1 720	16 400 9 700	7 700 4 770	7 100 3 480	2 800 1 680
2	V 3,4	A	3 900 2 140	8 700 3 220	8 750 2 010	8 500 1 360	1 400 1 010
3	M 3,6	A	4 000 960	5 000 3 650	3 700 1 550	6 700 2 500	2 850 1 080
4	V 3,8	A	2 500 930	7 000 3 430	3 800 1 860	6 000 1 080	2 350 560
5	V 3,9	A	7 600 4 940	11 700 6 100	7 100 4 900	5 700 2 800	4 800 2 380
6	V 3,11	B	7 300 2 560	5 500 3 560	3 700 1 630	6 400 2 500	3 600 1 190
7	V 4,4	A	4 350 1 220	14 300 5 300	3 500 950	6 200 930	3 400 950
8	V 5,9	B	5 000 2 000	8 500 3 060	3 500 2 200	4 500 2 840	5 800 1 280
9	V 10,1	B	3 600 1 150	9 900 2 880	3 500 1 010	3 800 1 250	2 250 720
10	M 10,2	B	1 600 320	7 000 2 520	2 300 740	2 350 350	1 100 490
11	M 10,3	A	4 400 1 440	14 300 3 150	6 100 920	9 900 2 670	8 000 1 200
12	M 15	A	1 600 850	9 900 3 560	5 100 1 170	5 200 1 250	6 100 1 830

Eerste reeks totaal aantal leucocyten/mm<sup>3</sup>

Tweede reeks totaal aantal lymfocyten/mm<sup>3</sup>

A/B onderhoudstherapie zonder/met cyclofosfamide

focyten en/of lymfoblsten zijn vele kinderen en enkele volwassenen onderzocht. Daarom kunnen wij bij 8 van de 12 onderzochte patienten beschikken over gegevens van voor alle therapie. Bij de patienten 1, 2, 3, 9 en 10 was bij het eerste onderzoek dus voor de remissie-inductie, het percentage lymfoblsten niet excessief ten opzichte van het percentage lymfocyten. Deze 5 patienten vertoonden geen daling van PHA-stimulatie bij het begin van de eerste consolidatiekuur.

## 5 BESCHOUWINGEN OVER DE RESULTATEN VAN DE EIGEN ONDERZOEKING

Onze opzet is niet zozeer geweest om het verloop van de immuniteit tijdens de therapie te vervolgen. De klinische ervaringen (zie Hoofdstuk IV en de paragraaf 1 van dit hoofdstuk) leren ons immers, dat de immuniteit verminderd en/of gestoord is tijdens de antileukemische therapie.

Wanneer de immuniteit extreem verminderd is, zijn de kansen op levensbedreigende infecties uitermate groot. De resultaten van het onderzoek sub 4.1 waren bemoedigend: tijdens de intensieve consolidatiekuur werd

TABEL V 13 PHA en PWM stimulatie voor therapie en na  $\pm$  11 weken therapie

Patient	leeftijd geslacht	$\frac{Ly^1}{LBC+Ly} \times 100$	voor begin van therapie				bij begin 1ste consolidatiekuur			
			PHA <sup>2</sup>		PWM <sup>2</sup>		PHA		PWM	
			-	+	-	+	-	+	-	+
1	M 1,10	84	550	38 100	1 390	12 940	600	61 500	-	-
2	V 3,4	70	290	31 200	380	16 060	260	33 600	230	14 700
3	M 3,6	75	790	24 200	1 350	12 600	540	25 500	-	-
4	V 3,8	20	8 190	92 800	17 900	35 900	650	52 920	2 490	7 080
6	V 3,11	0	130	3 610	-	-	160	21 700	200	4 000
9	V 10,1	86	2 810	60 200	20 000	52 900	490	24 300	2 390	3 750
10	M 10,2	98	170	59 800	500	17 900	350	49 700	-	-
12	M 15	50	1 190	19 100	-	-	400	20 600	-	-

<sup>1</sup> - (lymfocyten idem plus lymfoblasten)  $\times$  100<sup>2</sup> controlekweek -, toevoeging mitogenen +

NB De patientennummers corresponderen met die van tabel V-10, 11 en 12

immers een vast patroon gezien van de PHA stimulatie en van het aantal lymfocyten.

Uit de resultaten vermeld onder 4.2. blijkt echter reeds hoe complex het immuun-antwoord kan zijn geen enkele onderlinge correlatie kon aangetoond worden tussen de vier parameters, twee betreffende de cellulaire immuniteit en twee betreffende de humorale immuniteit

In het onderzoek sub 4.3 werd op vijf verschillende wijzen het reactievermogen van de lymfocyten nagegaan, maar ook hier valt weer op het ontbreken van een onderlinge samenhang. Van het totale in vivo aanwezige aantal lymfocyten vormen de in het bloed aanwezige slechts een zeer geringe fractie volgens Trepel (1974) is dit slechts 2,2%. Alleen deze fractie van de lymfocytenpopulatie laat zich zonder belasting voor de patient bij herhaling onderzoeken. Tegenover dit voordeel van het gemakkelijk kunnen isoleren staat ons inziens echter het nadeel dat, althans voor het meten van immuunsuppressie, onderzoek van deze fractie duidelijk te weinig informatie blijkt op te leveren.

Nadrukkelijk moet er nog eens op gewezen worden, dat verschillende onderzoekers (zie paragraaf 3) aangetoond hebben, op uiteenlopende wijzen, dat de immuniteit verstoord is tijdens antileukemische therapie. Van al deze onderzoeken kan men echter niet zeggen, dat daarbij ook een klinisch bruikbare parameter van de immuniteit is vastgesteld. D.w.z. het is wel mogelijk om met een reeks zeer uiteenlopende functiebepalingen een beeld te hebben van de immuniteit van de individuele patient. Niet mogelijk is het o.i. op dit moment om met een of enkele snel uitvoerbare bepaling(en) de immunologische capaciteit vast te leggen. Zoals er bij een verlaagde nierfunctie wel hanteerbare normen zijn voor bijv. de eiwitbeperking, zijn er t.a.v. immunosuppressie o.i. géén duidelijke maatstaven. Wanneer men zich realiseert, dat een vrij hoog percentage patienten overlijdt aan fatale infecties tijdens/door de chemotherapie, voelt men nog steeds de behoefte om deze therapie ook aan de graad van immuunsuppressie aan te passen. Onze resultaten wijzen er op, dat een van de grote problemen hierbij ook is de natuurlijke variatie van het immuunantwoord, zeer duidelijk blijkt dit uit onze bevindingen sub 4.2. betreffende de resultaten van de boostervaccinatie. Ook de resultaten uit sub 4.3. tenderen in dezelfde richting

Immuunsuppressie lijkt ons dan ook niet goed meetbaar te zijn, omdat het immuun-antwoord reeds van nature van persoon tot persoon sterk kan wisselen. Dat wil zeggen de response is wel doelmatig, maar de verschillende onderdelen van het lymfoïde systeem zijn per keer en van persoon tot persoon in onderling wisselende mate hierbij betrokken.

Wij hebben steeds onze resultaten van de meting met behulp van  $^3\text{H}$ -thymidine opgegeven in cpm/aantal cellen. Zeer groot blijkt dan ook bij reeds de variabiliteit van de PHA-stimulatie bij normale personen te zijn (tabel V-1). Indien men ratio's, verhoudingen tussen een of twee onderzoeken bij controle personen en dergelijke gebruikt (Jones c.s. 1971, Borella en Webster 1971, Schweitzer 1973) kunnen de vermelde getallen kleiner zijn. Op het eerste oog lijken de resultaten dan overzichtelijker,

maar de natuurlijke grote variabiliteit, die feitelijk aanwezig is, wordt daardoor minder duidelijk aangegeven

Het onderzoek sub 4.3 toont ons inziens wel duidelijk aan, dat weglaten van cytostatische onderhoudstherapie, dankzij of ondanks<sup>1</sup> de daaropvolgende therapie met vincristine en het lymfoblastolytische prednison een duidelijke stijging van het aantal lymfocyten geeft. Dit aantal is zeker van belang ten aanzien van de kans op ernstige infecties. Campbell e.s. (1973) toonden aan, dat bij de groep kinderen, die als C.Z.S.-leukemie profylaxe ook behandeld werden met bestraling van het ruggemerg – en aangrenzend lymfoïdweefsel en ductus thoracicus – er langer een lymfopenie aanwezig bleef tijdens de remissie. In deze groep traden significant vaker fatale infecties op dan in een groep waarbij ruggemergbestraling achterwege was gelaten.

## CONCLUSIE

Onze pogingen om met behulp van onderzoek in vitro naar het reactievermogen van lymfocyten immuunsuppressie te kwantificeren zijn niet geslaagd. Een van de belangrijkste oorzaken hiervoor lijkt het gegeven, dat onder normale omstandigheden de reacties van lymfocyten buitengewoon wisselend kunnen zijn. Dit blijkt onder andere uit de resultaten gevonden bij ons onderzoek met boostervaccinaties: de immunresponse is uniform doelmatig, maar van mens tot mens zeer wisselend in de verdeling van het aandeel der verschillende aspecten. Wij verwachten, dat een onderzoek naar lymfokinen e.d. evenzeer een negatief resultaat oplevert.

Prednison, dat bij de acute lymfoblastaire leukemie in consolidatiekuren steeds gebruikt wordt, blijkt volgens onze waarnemingen mede een stijging van het aantal bloed lymfocyten te geven en lijkt daarmee de door cytostatica gehavende afweer te verbeteren. Mogelijk zou daarom het gebruik van consolidatiekuren met prednison bij de behandeling van de A.L.L. gerechtvaardigd zijn.

DE AARD VAN DE PROLIFERERENDE CEL BIJ ACUTE  
LYMFOBLASTAIRE LEUKEMIE  
CFI KINETISCHE VERSCHILLEN TUSSEN ACUTE  
LYMFOBLASTAIRE LEUKEMIE EN ACUTE MYELOIDE  
LEUKEMIE

# INLEIDING

Inkele jaren geleden besloten wij om systematisch bij elke patient met een nog niet behandelde acute leukemie van de bloedlymfocyten en/of leukemische cellen een in vitro stimulatie met PHA te verrichten. De aanleiding hiertoe was het gegeven, dat uit de schaarse publicaties, die meestal slechts weinig patienten betroffen, niet goed was op te maken of de stimulatie van normale lymfocyten, leukemische cellen, of mengsels van beiden was nagegaan. Bovendien was niet steeds duidelijk aangegeven of de patienten reeds behandeld waren en waarmee en evenmin in welk stadium van de ziekte het onderzoek was verricht (Astaldi c.s. 1966, Kourilsky c.s. 1966). Uit onze voorlopige resultaten (de Vaan c.s. 1972) bleek, dat bloedlymfocyten bij het begin van de ziekte, vóór therapiebegin, slechts betrouwbaar te onderzoeken waren bij die patienten waar het bloed weinig of geen leukemische cellen bevatte. De stimulatie door PHA, en in een deel der gevallen ook door PWM bleek dan steeds normaal te zijn.

Een deel van de patienten had echter een uiterst laag percentage normale lymfocyten in het bloed; hoewel het absolute aantal redelijk normaal was. Deze patienten hadden 50 000 tot soms 360 000 leukemische cellen/mm<sup>3</sup> in het bloed. In dergelijke gevallen waren wij in staat om bij vrijwel puur leukemische celpopulaties de reactie op de genoemde mitogenen na te gaan. Tot onze verbazing bleken bij een deel van de onderzochte patienten de leukemische cellen te reageren op PHA en PWM. Wij zijn het dan ook niet eens met de opvatting van Schweitzer (1973), dat een positieve uitslag van de stimulatie test steeds berust op de bijmenging met normale lymfocyten. Deze is dermate laag, dat de normale lymfocyten (0-5%) niet verantwoordelijk kunnen zijn voor een stimulatie die 10-50% van de normale waarde bedraagt. Een en ander was voor ons een reden om reeds in 1972 (de Vaan c.s. 1972) een verband te suggereren tussen leukemische cellen en thymus afhankelijke lymfocyten c.q. T-lymfocyten. Het hier vermelde onderzoek wordt elders gepubliceerd (de Vaan c.s. 1975).

De laatste jaren zijn er methodieken ontwikkeld om de functioneel verschillende soorten lymfocyten te onderscheiden; toepassing van deze methodieken bij homogene populaties van leukemische cellen heeft het duidelijk gemaakt dat bij leukemie en bij het maligne lymfoom de prolifererende cellen kenmerken kunnen hebben van ofwel T- of B-lymfocyten. (zie paragraaf 3).

Onze eigen onderzoeken willen wij belichten mede vanuit de nieuwe inzichten, die hierover de laatste jaren zijn verkregen; allereerst dient dan besproken te worden:

1. de ontwikkeling van T- en B-lymfocyten
2. de eigenschappen van rijpe T- en B-lymfocyten
3. T- en B-lymfocytenmerken van de maligne cel bij lymfoproliferatieve aandoeningen en bij leukemieën.

#### 1. DE ONTWIKKELING VAN T- EN B-LYMFOCYTEN

Hierbij kan men twee, op zich niet identieke, ontwikkelingen onderscheiden. Enerzijds kan men zich afvragen op welk tijdstip intra-uterien of na de geboorte volwaardige T- en B-lymfocyten aanwezig zullen zijn, hoe de grootte van de lymfocytenpool is en de localisatie e.d. Anderzijds kan men zich afvragen hoe de ontwikkeling verloopt van ongedifferentieerde stamcel via een nog niet door een antigeen c.q. immunogeen beïnvloede onrijpe lymfocyt tot een rijpe T- of B-lymfocyt.

Ten aanzien van de eerste vraag weten wij, dat reeds zeer vroeg in de levensloop van de mens, namelijk in de intra-uteriene fase immunocompetente cellen aanwezig zijn (zie bijv. Prindull 1974). De aanwezigheid van B-lymfocyten in het beenmerg, zowel in de foetale periode als postnataal, werd overtuigend aangetoond door Vossen en Hijmans (1975). Verder weten wij, dat intra-uterien en direct na de geboorte, zij het minder doeltreffend dan later, in vele gevallen een behoorlijke immuunresponse door het ongeboren kind c.q. de jonge zuigeling kan worden opgebracht.

Wat de tweede vraag betreft, namelijk: hoe loopt de ontwikkeling van de stamcel via onrijpe voorlopers tot volwaardige 'volwassen' lymfocyten, hiervoor biedt de literatuur weinig uitkomst (Meuwissen c.s. 1969, Craddock c.s. 1971, Elves 1972, Prindull 1974). De stadia van de ontwikkeling zijn morfologisch onbekend i.t.t. de stadia van de ontwikkeling van bijv. erythroblast en myeloblast tot resp. erythrocyt en granulocyt. Evenmin is bekend of T- en B-lymfocyten zich geheel los van elkaar ontwikkelen of dat B-lymfocyten zich hiervan afscheiden in een zeer vroeg, nog gemeenschappelijk verlopend, ontwikkelingsstadium.

Bij de erythropoïese en bij de granulocytopoïese kan men grosso modo zeggen dat de wezenlijke kenmerken van deze celsoorten, namelijk het bevatten van hemoglobine, resp. een fagocyterend vermogen reeds in de jongste, morfologisch herkenbare ontwikkelingsstadia aanwezig zijn. Indien dit ook zou opgaan voor de lymfocytopoïese vanuit ongedifferentieerde stamcellen zou dit een of andere vorm van immunocompetentie moeten zijn. De basisvoorwaarde voor de specifieke immuniteit is de mogelijkheid tot het herkennen c.q. het bewaren van het immunologisch geheugen ten aanzien van het immunogeen.

Hoe men dit morfologisch, histochemisch of anderszins moet aantonen is nog een open vraag.

Van de T-lymfocyt weten wij, dat deze celsoort door/in de thymus een soort 'afsluitende' behandeling ondergaat, waardoor hij tot een volwaardige uitgerijpte cel wordt. Van de ontwikkeling van de B-lymfocyten is

weinig bekend. Uit de onderzoeken van Dickler c.s. (1974) van de lymfocyten bij patiënten lijdende aan, congenitale?, vormen van hypogammaglobulinemie blijkt, dat hieraan volgens deze auteurs de volgende defecten ten grondslag kunnen liggen:

a. onvermogen om tot immuunglobuline vormende plasmacellen te transformeren.

b. onvermogen om voldoende immuunglobuline op de celwand te dragen.

c. onvermogen van de B-lymfocyten om hun specifieke celmembraan-markers te vormen.

d. de lymfocyten missen de mogelijkheden sub a, b en c, maar tonen naast B-kenmerken ook T-lymfocyt-kenmerken.

e. er zijn géén B-lymfocyten.

In hoeverre dergelijke resultaten ook door andere onderzoekers bevestigd zullen worden is nog de vraag. Hun onderzoek wijst er echter op, dat het normale verloop mogelijk sprongsgewijs is. Bovendien wijst het op de mogelijkheid, dat B-lymfocyten uit jonge, onrijpe T-lymfocyten zouden kunnen ontstaan.

Deze bespiegelingen over de ontwikkeling van ongedifferentieerde stamcellen tot rijpe lymfocyten zijn in dit hoofdstuk toch op zijn plaats. De maligne aandoeningen die typisch zijn voor de kinderleeftijd, gaan veelal uit van minder gedifferentieerde cellen of van weefsels met embryonale kenmerken. Omdat acute lymfoblastaire leukemie een ziekte is die vooral bij kinderen en jonge volwassenen voorkomt, is het niet ondenkbaar, dat de prolifererende cellen hier of 'embryonale' kenmerken hebben of uitgaan van nog in een rijpingsstadium verkerende cellen. Dit laatste is niet onmogelijk gezien het 'negatieve' argument, dat maligne aandoeningen van uitgerijpte cellen (bijvoorbeeld carcinomen, chronische lymfatische leukemie, plasmacytoom) bij kinderen en jonge volwassenen niet of nauwelijks voorkomen.

## 2. DE EIGENSCHAPPEN VAN RIJPE T- EN B-LYMFOCYTEN

Het is sinds enkele jaren pas mogelijk gebleken om afzonderlijke lymfocyten als T- of B-lymfocyt te determineren. Zo weet men pas sinds 1970 dat de B-lymfocyten immuunglobulinen op de celmembraan dragen (Raff c.s. 1970), de vorming van rozetten door T-lymfocyten met schape-erythrocyten is ook van recente datum (Lay c.s. 1971).

Sindsdien zijn nog een aantal T en B 'markers' gevonden en de tijd zal moeten leren welke een grote betrouwbaarheid in specificiteit aan gemakkelijke uitvoerbaarheid van de bepaling paren.

De opgave die hier gegeven wordt van B- en T-lymfocytkenmerken is daarom over enkele jaren mogelijk geheel verouderd.

1. Kenmerken van B-lymfocyten (volgens Bentwich en Kunkel 1973).  
Op de celmembraan zijn aanwezig:

receptoren voor complement; schape-erythrocyten met antistof bedekt, kunnen daardoor rozetten vormen met B-lymfocyten indien dit mengsel met complement wordt geïncubeerd; erythrocyt-antilichaam-complement



of E.A.C.-rozetten.

receptoren voor hitte-geaggregeerd gammaglobuline

immuunglobulinen die niet passief zijn geadsorbeerd

electronenmicroscopisch zijn deze cellen bezet met talrijke lange villi (Lin c.s. 1973).

Zij kunnen zich transformeren tot immuunglobuline secernerende cellen c.q. plasmacellen.

Zij laten zich in veel mindere mate door aspecifieke mitogenen, zoals PHA en PWM, stimuleren tot transformatie en deling dan T-lymfocyten (Smith en Haegert 1974).

2. Kenmerken van T-lymfocyten (volgens onder andere Bentwich en Kunkel 1973, Brown c.s. 1974).

de celmembraan is zodanig, dat zij met schape-erythrocyten spontaan rozetten kunnen vormen, zonder toevoegingen van complement of antilichaam; schapen rode bloedcel-rozetten: SRBC of T-rozetten.

electronenmicroscopisch zijn zij glad i.t.t. B-lymfocyten (Lin c.s. 1973).

zij zijn aantoonbaar met antithymocyten-serum (Brown c.s. 1974).

door aspecifieke mitogenen worden overwegend en voor het merendeel de T-lymfocyten gestimuleerd tot transformatie en deling (Smith en Haegert 1974).

In het kader van het eigen onderzoek lijkt een uitputtender beschrijving van de mérites der verschillende andere kenmerken die bekend zijn en van de problemen aangaande de nauwkeurigheid in determinering van de hier vermelde kenmerken niet op zijn plaats. Wel moet nog nadrukkelijk worden vermeld, dat met PHA en PWM zich overwegend T-lymfocyten laten stimuleren. Dit blijkt uit het aanwezig zijn en blijven van T-lymfocyten-kenmerken tijdens deze stimulatie testen (Smith en Haegert 1974, Collins c.s. 1974).

### 3. KENMERKEN VAN T- EN B-LYMFOCYTEN VAN DE MALIGNIE CEL BIJ LYMFOPROLIFERATIEVE AANDOENINGEN EN BIJ LEUKEMIEËN

#### 3.1. *Algemene opmerkingen*

Bij vele maligne aandoeningen is het zonder meer duidelijk wat de oorsprong en aard van de prolifererende cellen is. Dit geldt voor vele carcinomen en sarcomen. Bij het jonge kind is het vaak mogelijk, dankzij de kennis van het embryonale weefsel, de ware aard vast te stellen. Zo heeft bijvoorbeeld het rhabdomyosarcoom kenmerken gemeen met het spierweefsel van de 8ste tot 16de week van de intra-uteriene ontwikkeling.

Bij de myeloïde en erythroleukemie is het ook geen probleem om te zien welke soort cellen tot een maligne groei is gekomen. Uit de naamgeving van de acute lymfoblastaire leukemie: acute stamcel-, acute blasten-, parablasten leukemie blijkt, dat hierbij lang onzekerheid heeft bestaan over de ware aard. Hetzelfde geldt om deze reden, ook voor de wat vage benamingen als chronische lymfatische leukemie en maligne lymfoom. Hieronder zullen ten aanzien van deze aandoeningen een aantal, zeker niet alle, literatuurgegevens worden besproken.

### *3.2. T- en B-lymfocyt kenmerken van de prolifererende cel bij de chronische lymfatische leukemie (C.L.L.)*

Bij kinderen en bij jonge volwassenen komt deze ziekte niet of nauwelijks voor. Verschillende onderzoekers hebben aangetoond, dat de maligne cel duidelijke B-lymfocyt kenmerken heeft. Slechts bij uitzondering worden T-lymfocyt kenmerken aangetroffen. Het celmembraan gebonden immuunglobuline blijkt bij de overgrote meerderheid van de maligne cellen van dezelfde patient steeds identiek te zijn; het is gebleken in de meeste gevallen IgM te zijn met of kappab of lambdaketen (Aisenberg c.s. 1973, Seligmann c.s. 1973, Catovsky c.s. 1974). De C.L.L. kan overgaan in een acute leukemie; Brouet c.s. (1973) toonden bij de twee door hen onderzochte patienten aan, dat de maligne cellen allen hetzelfde IgM-type dragen. Dit alles wijst er op, dat de C.L.L. een B-lymfocytwoekering is waarbij dit gezien de eenvormigheid van het celmembraan Ig, bij elke afzonderlijke patiënt om een monoclonale woekering lijkt te gaan (zie ook Seligmann c.s. 1973). Ook andere B-lymfocyt kenmerken zijn aanwezig: Shevach c.s. (1973) wijst erop, dat de maligne cel zogenaamde E.A.C.-rozetten (zie 2.1.) kan vormen. T-lymfocyten kenmerken ontbreken geheel: er treedt geen reactie op met antithymocyten serum (Aisenberg c.s. 1973) en het vermogen om T-rozetten of SRBC-rozetten (zie 2.2.) te vormen ontbreekt eveneens (Ross c.s. 1973). In 1969 werd door Bouroncle c.s. beschreven, dat C.L.L.-lymfocyten in mindere mate en vertraagd op PHA reageerden: hun bevindingen zijn in het licht van het bovenstaande nu beter verklaarbaar. Ook het ontbreken van een reactie van deze C.L.L.-lymfocyten met antithymocyten serum wijst op het niet T-lymfocyt-zijn van deze cellen (Aisenberg c.s. 1973). Sporadisch is beschreven, dat bij C.L.L. de prolifererende cel alleen T-lymfocyten kenmerken heeft. Brown c.s. (1974) onderzochten 11 patiënten: 9 x vonden zij een B-lymfocyt C.L.L., 1 x een T-lymfocyt-C.L.L. en 1 x een zogenaamde 'nulcel'-C.L.L., waarbij dus geen enkel T of B-lymfocytkenmerk aangetoond kan worden.

De C.L.L. betreft dus meestal een monoclonale celwoekering van B-lymfocyten. In dit verband mag er ook op gewezen worden, dat woekeringen van immuunglobuline-secrenerende cellen (c.q. M. Kahler, monoclonale gammopathiën) bij kinderen of niet of uiterst zelden voorkomen (zie voor deze problematiek bijvoorbeeld Stoop c.s. 1969).

### *3.3. T- en B-lymfocyt kenmerken bij het maligne non-Hodgkin-lymfoom en lymfosaroom*

Ter illustratie van de bevindingen bij deze ziekten mogen hier enkele publicaties worden besproken. Het aantal mededelingen is veel minder talrijk dan ten aanzien van de C.L.L. en A.L.L. Een van de eerste waarnemingen werd gedaan door Smith c.s. (1973). Zij beschrijven een 2-jarige jongen met een mediastinaal lymfosaroom. Opvallend is daarbij, dat de maligne cellen uit deze tumor niet op PHA reageerden, maar wel het vermogen hadden om met schape-erythrocyten spontaan rozetten te vormen. De auteurs menen daarom, dat deze maligne cellen verwant zijn met

T-lymfocyten: zij hebben een 'statisch' kenmerk, maar missen een dynamisch kenmerk.

Van een aantal publicaties zijn de resultaten in tabelvorm weergegeven (tabel VI-1). Zowel bij kinderen als bij volwassenen worden bij de maligne cellen vrijwel steeds of T- of B-lymfocyt kenmerken gevonden. Indien men er vanuit gaat, dat in het lymfoïde weefsel slechts uitgerijpte, al of niet delende, lymfocyten aanwezig zijn, terwijl in het beenmerg een deel van de lymfoïde cellen onderweg is in de rijping van stamcel tot lymfocyt, is dit niet zo verwonderlijk.

TABEL VI-1 *B- en T-kenmerken van de prolifererende cel bij het non-Hodgkin maligne lymfoom*

auteurs, jaartal	aantal patienten	histologisch type	gebruikte technieken	immunologisch type v/h lymfoom
Smith c.s. (1973)	één, M 2 j.	lymfosarcoom, mediastinaal gelocaliseerd	PHA: geen reactie T: E-rozetten pos.	T-lymfocyt
Wilson en Hurdle (1973)	3 (volw.)	lymfosarcoom	oppervlakte Ig	B-lymfocyt 2x T-lymfocyt 1x <sup>?</sup>
Seligmann c.s. (1973)	4 (volw.)	lymfosarcoom	B: oppervlakte Ig 3x IgM type. 1x IgG type	B-lymfocyt 4x
Shevach c.s. (1973)	1	lymfosarcoom	B: E.A.C -rozet- ten 87% pos.	B-lymfocyt
Peter c.s. (1974)	10 (volw.)	5 x nodulair lymfoom	T: E-rozetten B: Fc rozetten* oppervlakte Ig.	B-lymfocyt 3x T-lymfocyt 1x 'nulcel' 1x**
		5 diffuus lymfoom	zelfde technieken	B-lymfocyt 3x T-lymfocyt 1x 'nulcel' 1x
Jaffe c.s. (1974)	6	nodulair lymfoom	T: E-rozetten B: EAC-rozetten	B-lymfocyt 6x
Kaplan c.s. (1974)	4 (kind.)	lymfosarcoom	T: E-rozetten B: oppervlakte Ig	T-lymfocyt 4x EAC-rozetten

*Verklaring*

\* Fc rozetten: rozetvorming met geaggregeerd gammaglobuline

\*\* 'nulcel': T- of B-lymfocyt-kenmerken ontbreken

De toekomst zal echter moeten leren hoe de frekwentie van voorkomen van T-lymfocyt, B-lymfocyt en 'nulcel'-lymfomen zal zijn, en of de frekwenties van deze drie typen bij kinderen en volwassenen verschillen. Voorlopig lijkt het er wel op, dat bij deze groep aandoeningen de maligne cel vaker en duidelijker immunologisch te karakteriseren is dan bij de A.L.L. (zie 3.4). In sommige gevallen kan het duidelijk aanwezig zijn van T- of B-lymfocytkenmerken een hulp zijn bij de afscheiding van enerzijds het gedissemineerde lymfosarcoom en de A.L.L. Dit blijkt uit de publicatie van Flandrin c.s. (1975). Zij onderzochten 6 patiënten met het zogenaamde Burkitt-like lymfosarcoom: de maligne cellen in het beenmerg

waren in alle opzichten als B-lymfocyt te karakteriseren. Verdere systematische vergelijking met enerzijds de immunologische kenmerken en anderzijds de histologie enz. van het maligne lymfoom zal zeker ons inzicht in de etiologie van deze aandoeningen kunnen vergroten.

#### 3.4. T- en B-lymfocyt kenmerken bij de A.L.L.

Eerder in dit hoofdstuk werden enkele B- en T-lymfocyt kenmerken of markers genoemd. Verschillen in technieken maken een goede beoordeling van alle gepubliceerde resultaten niet goed mogelijk. In tabel VI-2 is getracht een overzicht te geven van de onderzoeken betreffende leukemische cellen van acute lymfoblastaire leukemie.

TABEL VI-2 B en T-lymfocyt-kenmerken van leukemische cellen bij A.L.L.

auteurs, jaartal	aantal patienten	gebruikte technieken	resultaat
Borella en Sen (1973)	4	T E-rozetten	3 x negatief 1 x 26% in bloed en 62,5% in beenmerg
Shevach e s (1973)	4	B oppervlakte Ig	4 x negatief
		B EAC-rozetten	4 x negatief
		IgG-EA-rozetten*	4 x negatief
Seligmann e s (1973)	34 (24 kinderen 10 volwass.)	T E-rozetten	3 x kinderen. 76-95% 3 x kinderen 20-30%
		B oppervlakte Ig	28 x negatief 33 x negatief 1 x positief
Melief e s (1973)	6**	T E-rozetten	3 x negatief
		B EAC-rozetten	3 x resp. 16, 23 en 44% 4 x negatief
Collins e s (1974)	6	B EAC-rozetten	2 x resp. 75 en 55%
		oppervlakte Ig	6 x negatief
Kaplan e s (1974)	8	T E-rozetten	6 x negatief
		B EAC-rozetten	8 x negatief
		oppervlakte Ig	7 x negatief 2 x 9% 3 x bepaald 3 x negatief
Belpomme e s (1974)	20	T E-rozetten	15 x negatief
		B EAC-rozetten	5 x 35-80%
		oppervlakte Ig	20 x negatief 17 x bepaald 17 x negatief
Schwenk (1974)	8	T E-rozetten	1 x sterk positief
		7 x $\pm$ negatief	
		B oppervlakte Ig	8 x negatief
Brown e s (1974)	22	T 3 'markers'	18 x allen negatief
		B 4 'markers'	4 x 2 of 3 markers 22 x geheel negatief

#### Verklaring

\* = IgG LA-rozetten-test B-rozetten variant

\*\* = in de publicatie is bij een van de zeven patienten niet duidelijk wat het % lymfoblasten in het bloed was

Ook hier bestaat weer het probleem, dat soms niet nauwkeurig is opgegeven in welke percentages de onderzochte celsuspensies uit normale lymfocyten respectievelijk leukemische cellen bestaan de publicaties van bijvoorbeeld Chin c s (1973) en Astaldi Jr (1974) zijn daardoor volledig onbeoordeelbaar. Bij het onderzoek van Jondall c s (1973) wordt 3 x het percentage blasten niet vermeld, 4 x varieert het van 18 tot 63%, en 2 x is het hoog respectievelijk 85 en 99%. De resultaten van dergelijke onderzoeken lenen zich niet voor evaluatie.

In de tabel zijn alleen die artikelen vermeld, waarin de kenmerken van alleen leukemische cellen zijn nagegaan. Hoewel niet alle onderzoeken goed onderling vergelijkbaar zijn, blijkt hieruit, dat B-lymfocyt kenmerken vrijwel steeds geheel afwezig zijn. Slechts bij een deel (20-25%) van de onderzochte patienten hebben de leukemische cellen T-lymfocyt-kenmerken, waarbij het percentage blasten bij de individuele patient met zo'n kenmerk wisselend hoog is.

Catovsky c s (1974) onderzochten de lymfoblasten van 2 patienten en vonden een zeer hoog %, T of SRBC-rozetten. Zij concluderen hieruit, ons inziens voorbarig, dat dit een aparte variant van de A L L betreft. In de discussie van onze eigen bevindingen zullen wij hierop terugkomen.

De aanwezigheid van immuunglobuline (Ig) op de lymfoblast kan berusten op adsorptie van serum Ig, zoals Seligman c s (1973) vaststelden: het is niet onmogelijk, dat dit blokkerende antilichamen tegen leukemie geassocieerde antigenen betreft (Plenert c s 1974). De aanwezigheid van immuunglobuline, waarvan overigens de antilichaamspecificiteit niet vaststaat, zou verder betekenen, dat de prognose slechter is (Stevenson en Mott 1974, Astaldi Jr c s 1974). In ieder geval betekent hun aanwezigheid niet zonder meer dat de lymfoblast een B-lymfocyt kenmerk heeft.

Opvallend is dat in de publicaties na 1972 niet het gebruik is vermeld van de stimulatie door PHA en PWM, met uitzondering van Melief c s (1973). Laatstgenoemden menen, dat de response op PHA veroorzaakt wordt door een klein aantal nog aanwezige normale lymfocyten. Het is ons inziens echter niet begrijpelijk, zoals reeds vermeld, dat 1-5% lymfocyten in staat zijn om een totale stimulatie te geven die 10-50% van de stimulatie is van een suspensie bestaande uit 100% normale lymfocyten. Als de leukemische cellen op zich niet rechtstreeks stimuleerbaar zijn zou een hoge graad van stimulatie nog kunnen berusten op recrutering van deze leukemische cellen door de weinige nog aanwezige normale lymfocyten.

Het onderzoek van Astaldi Sr c s (1972) is ons inziens niet te interpreteren, zij gingen de stimulatie na van beenmergblasten en vonden dat deze laag tot afwezig was: mogelijk hebben de blasten nog geen 'thymusstage' doorgemaakt. Dat liquor-lymfoblasten niet reageerden, is ons inziens niet zo verwonderlijk, deze zijn zo kwetsbaar in vitro, dat het ontbreken van een reactie in vitro niets bewijst. Ook over het verdere onderzoek van bloedcellen valt weer op te merken, dat de exacte gegevens (percentage lymfocyten, percentage blasten) ontbreken. In feite kan men stellen, dat behalve de exacte gegevens van Melief c s (1973) over de stimulatie door onder andere PHA nauwelijks betrouwbare gegevens bestaan.

## CONCLUSIE

De punten 3.1 t/m 3.4 samenvattend is het duidelijk, dat een vrij nauwkeurige typering van deze groep ziekten mogelijk wordt indien 'markers' worden gebruikt. Of deze typering door 'markers' te zijner tijd gebruikt zal kunnen worden bij de keuze van de therapie, de beoordeling van prognose en behandelbaarheid zal de tijd moeten leren.

In ieder geval is onze kennis verrijkt met een grondiger kennis van de aard van de prolifererende cel, wat mogelijk tot verbeterde inzichten kan leiden van de pathogenese van deze groep aandoeningen.

## 4 TIJDEN ONDERZOEK

### 4.1 *Vraagstelling*

In de inleiding is reeds vermeld, dat het onderzoek naar de stimuleerbaarheid door PHA van bloedlymfocyten en/of leukemische cellen werd begonnen omdat er naar meer betrouwbare gegevens gezocht moest worden. Een van de vragen die wij ons toen stelden was hoe reageren de, nog in het bloed aanwezige, normale lymfocyten op PHA en PWM. De beantwoording van deze vraag zegt iets over de T-lymfocyt-afhankelijke immuniteit (zie hoofdstuk III). Anderzijds meenden wij, dat door middel van deze stimulatie mogelijk iets gezegd kon worden over de immuno-competentie van leukemische cellen, een vraag die belangwekkender werd, gezien de aanwijzingen dat bij een deel van de A L L patiënten de blasten T-lymfocyt kenmerken hebben (zie 3.4).

Om een eventuele invloed van de therapie uit te sluiten werd het onderzoek steeds verricht voor het begin van de therapie of, bij patiënten met A L L eveneens ten tijde van de rechute. Deze patiënten ontwikkelden een rechute op een therapie die de PHA-stimulatie niet beïnvloedde (Bakkeren *et al.* 1972). In eerste instantie werden de leukemische cellen van patiënten, lijdende aan zowel A L L als lijdende aan A M L bestudeerd. Omdat er een opvallend verschil bleek te zijn, werd hiermee later doorgegaan.

### 4.2 *Onderzoeken bij patiënten lijdende aan A L L*

#### 4.2.1 *Onderzoek door middel van aspecifieke mitogenen*

#### 4.2.2 *Onderzoek door middel van 'rozetten-testen'*

4.2.1 De gebruikte technieken worden beschreven in Hoofdstuk VII, en komen overeen met die gebruikt bij de onderzoeken vermeld in Hoofdstuk V.

#### a *Onderzoek bij onbehandelde A L L door middel van PHA*

In totaal werden bij 55 patiënten de bloedlymfocyten en/of leukemische cellen onderzocht door middel van PHA stimulatie. Juist bij kinderen wordt nogal eens gezien, dat de ziekte debuteert op een moment dat er weinig of geen leukemische cellen in het bloed circuleren. Bij 14 patiënten (12 kinderen, 1 adolescent en 1 volwassene, kon derhalve de stimuleerbaarheid van de normale lymfocyten worden nagegaan (Tabel VI-3).

TABEL VI-3 PHA-stimulatie bij onbehandelde A L L. patienten met < 15% lymfoblasten

Patient	leeftijd <sup>1</sup> geslacht	totaal WBC/mm <sup>3</sup>	$\frac{\text{LBC}}{\text{LBC}+\text{Ly}} \times 100$	- PHA <sup>3</sup>	+ PHA <sup>3</sup>
1	50 V	1 400	0	1 640	48 900
2	33 V	1 400	9	520	91 400
3	46 V	1 800	0	-	27 140
4	10 M	1 800	2	170	59 800
5	7 V	2 000	14	2 810	60 200
6	17 M	2 400	0	3 560	84 400
7	40 V	2 500	5	2 060	95 000
8	54 M	2 600	8	570	53 000
9	66 M	2 800	0	130	51 900
10	15 M	3 500	0	420	34 700
11	13 M	4 000	0	640	68 400
12	1,10 M	4 100	12	560	38 140
13	2,5 V	5 900	13	2 100	28 700
14	3,2 M	8 200	0	480	3 300

*Verklaring*

<sup>1</sup> leeftijden in jaren, maanden

<sup>2</sup> LBC (LBC+Ly) x 100 - leukemische cellen (idem + lymfocyten) x 100

<sup>3</sup> <sup>3</sup>H-thymidine incorporatie in cpm/500 000 leukemische cellen + lymfocyten

PHA stimulatie bij 26 normale kinderen gemiddeld  $\pm$  S D 43 000  $\pm$  3 800

PHA stimulatie bij patient 1 t/m 14 gemiddeld  $\pm$  S D 57 000  $\pm$  6 300

TABEL VI-4 PHA-stimulatie bij onbehandelde A L L. patienten met 15-70% lymfoblasten

Patient	leeftijd geslacht	totaal WBC/mm <sub>3</sub>	$\frac{\text{LBC}}{\text{LBC}+\text{Ly}}$	x 100	- PHA	+ PHA
1	3,5 M	3 000	25		790	24 200
2	4,7 M	3 900	20		610	82 600
3	11,2 V	5 800	17		590	36 000
4	5,8 V	6 200	18		1 020	44 400
5	3,3 M	8 000	24		390	16 300
6	3,4 V	5 100	30		285	31 200
7	5,7 M	8 400	55		2 100	10 700
8	3,7 M	9 200	33		1 320	54 930
9	14 M	6 000	35		1 140	39 500
10	13 M	6 500	48		200	20 400
11	11 V	3 300	50		860	45 400
12	15 M	9 100	50		1 190	19 100
13	4,7 V	12 900	53		6 400	45 430
14	21,1 V	18 000	63		870	36 700
15	3,6 V	20 100	66		9 700	17 200
16	5,6 V	8 300	70		740	9 500
17	56 V	13 100	70		640	11 600

*Verklaring* zie tabel VI-3

Bij 17 patienten varieerde de verhouding in het bloed tussen leukemische cellen en normale lymfocyten van 3,5:1 tot 0,5:1 (Tabel VI-4). In feite weten wij niet welke cellen hebben bijgedragen tot het resultaat van de stimulatie. Alleen uit de gegevens, verkregen bij de 24 patienten, waarbij in het bloed het percentage leukemische cellen zeer hoog was (Tabel VI-5), is iets met zekerheid te zeggen over de stimuleerbaarheid door middel van PHA van leukemische cellen.

TABEL VI-5 PHA-stimulatie bij onbehandelde A.L.L. patienten met 70-100% lymfoblsten

Patient	leeftijd geslacht	totaal WBC/mm <sup>3</sup>	$\frac{\text{LBC}}{\text{LBC}+\text{Ly}} \times 100$	- PHA	+ PHA
1	6,0 M	700	95	400	10 200
2	3,10 V	5 300	80	8 190	92 800
3	14 M	14 600	75	280	1 380
4	1,10 M	16 400	90	3 560	44 800
5	0,7 M	20 600	80	630	33 500
6	5,5 V	22 000	100	230	15 100
7	5,8 M	23 500	100	1 010	23 800
8	4,0 V	24 000	100	130	3 610
9	2,6 V	25 400	83	100	2 840
10	4,8 M	26 700	75	560	6 700
11	7,0 M	28 500	72	7 900	21 600
12	3,0 V	35 000	98	460	22 400
13	5,8 V	35 000	77	270	325
14	16 M	45 300	100	1 000	2 050
15	17 V	59 000	95	2 900	4 700
16	3,8 V	60 200	95	120	360
17	0,7 V	66 000	95	250	6 100
18	6,10 M	76 400	100	120	130
19	5,0 M	95 400	95	290	2 110
20	10,0 V	104 000	100	270	280
21	21,0 V	104 000	100	310	2 250
22	6,2 V	165 000	100	2 400	2 500
23	7,3 M	224 000	100	2 430	2 940
24	0,5 V	300 000	100	360	5 960

Verklaring zie tabel VI-3

b. Onderzoek bij onbehandelde A.L.L. door middel van PWM

Bij 19 van de 55 onderzochte patienten werd naast de PHA-stimulatie tevens een PWM stimulatieproef verricht (zie tabel VI-6)

c. Onderzoek bij rechute van A.L.L.

Bij 16 patienten, allen kinderen, werden 21 waarnemingen gedaan (tabel VI-7)

Wanneer men de gegevens van de onderzoeken sub a, b, c tesamen bezieet, blijkt, dat bij een groot deel van de onderzochte patienten evaluatie van de PHA en PWM-stimulatie niet mogelijk is; immers alleen bij onderzoek van hoge percentages lymfoblsten of lymfocyten is het mogelijk om te weten welke celsoort aan het resultaat heeft bijgedragen. Wel lijkt bij die patienten waar zulks beoordeelbaar was, de lymfocyten stimulatie door PHA en eventueel door PWM normaal te zijn (tabel VI-3, tabel VI-6 bovenste



TABLE VI-6 PH 1 en PWM-stimulatie bij onbehandelde A I I

Patient	leeftijd geslacht	totaal WBC/mm <sup>3</sup>	$\frac{IBC}{LBC+Ly} \times 100$	controlekeek		+ PHA	+ PWM
				72 uur	144 uur	72 uur	144 uur
4	10 M	1 800	2	170	500	59 800	17 900
10	15 M	3 500	0	480	540	34 700	19 400
11	13 M	4 000	0	640	1 200	68 400	15 230
12	1,10 M	4 100	12	560	1 530	38 140	14 200
14	32 M	8 200	0	480	600	3 300	750
1	3,6 M	3 000	25	790	1 350	24 200	12 600
2	47 M	3 900	20	610	910	82 600	15 400
4	33 M	9 000	24	390	150	16 300	14 200
5	34 V	5 100	30	285	380	31 200	16 100
9	11 V	3 300	50	860	600	45 400	49 600
11	47 V	12 900	53	6 400	3 500	45 430	40 000
14	56 V	8 300	70	740	880	9 500	9 200
15	56 V	13 100	70	640	4 000	11 600	43 600
2	310 V	5 300	80	8 190	17 900	92 800	35 900
11	58 V	35 000	77	270	350	325	700
12	16 M	45 300	100	1 000	400	2 050	920
15	0,7 V	66 000	95	250	270	6 100	4 720
19	21 V	104 000	100	310	300	2 250	600
22	05 V	300 000	100	360	340	5 960	1 170

Verklaring zie tabel VI-3

De patienten-cijfers van elk vak corresponderen met die van de tabellen VI-3, 4 en 5

TABLE VI-7 PH 1-stimulatie ten tijde van de rechute bij A L L

Patient	leeftijd geslacht	totaal WBC/mm <sup>3</sup>	$\frac{IBC}{IBC+IV} \times 100$	- PHA	+ PHA
A	7,11 M	1 200	2	460	29 700
B	13 M	1 300	2	765	6 600
A	74 M	2 600	0	320	810
C	40 V	2 800	0	260	15 400
F	05 M	6 700	0	600	77 600
F	5,0 V	7 200	0	420	34 600
G	33 M	3 750	10	400	31 100
G	3,11 M	2 300	20	530	18 700
H	5,7 M	14 100	33	8 330	47 800
I	11 V	7 000	45	160	17 600
J	7,6 M	3 600	55	410	17 400
B	139 M	5 600	56	510	19 400
C	42 V	5 800	70	1 160	56 200
K	33 V	7 200	80	1 200	34 000
L	55 M	31 000	72	2 550	11 600
K	39 V	11 300	95	1 420	10 900
M	210 M	80 000	100	150	13 700
N	8,8 M	100 000	98	160	350
O	99 V	130 000	97	270	200
P	76 M	160 000	98	870	1 640
N	92 M	250 000	98	210	130

Verklaring Zie tabel VI-3 de letters wijzen steeds dezelfde patient aan, 21 waarnemingen bij 16 patienten

blok) Patient 14 (tabel VI-3) is hierop een uitzondering. Dit was een jongen die reeds een aantal maanden een hypoplastische anemie vertoonde met een zeer celarm beenmerg, zonder duidelijke leukemische kenmerken.

Ten tijde van de rechute lijken de lymfocyten minder stimuleerbaar te zijn door PHA (tabel VI-7, bovenste 7 waarnemingen). Ons inziens heeft de stimulatie door PWM geen andere informatie geleverd dan de stimulatie door PHA alleen.

Bij die patiënten, waarbij in het bloed het percentage leukemische cellen op het totaal van leukemische cellen en normale lymfocyten groter was dan 75%, werd bij 4 van de 8 een evidente stimulatie door PHA gezien (tabel VI-7, onderste blok).

#### 4.2.2 Onderzoek door middel van zogenaamde rozettentest bij A L L

Hierbij werden de bloedlymfocyten en/of leukemische cellen onderzocht met twee testen, namelijk de spontane schape-erythrocyten rozetten test (SRBC- of F-rozetten test), een T-lymfocyt-kenmerk en de erythrocyt-antilichaam-complement rozetten test (EAC-rozettentest), een B-lymfocyt-kenmerk.

Deze methodieken worden elders vermeld in Hoofdstuk VII. De resultaten zijn samen met die van eventueel ook uitgevoerde PHA-stimulatie vermeld op tabel VI-8. In totaal werden de rozetten testen uitgevoerd bij

TABEL VI-8 PHA stimulatie en rozettenproeven bij onbehandelde A L L

Patient	leeftijd geslacht	totaal WBC/mm <sup>3</sup>	$\frac{\text{IBC}}{\text{LBC} + \text{Lx}} \times 100$	rozettentest LAC	E	PHA stimulatie - PHA	+ PHA
1	3.6 M	3.000	25	27	65	790	24.200
2	13 M	3.200	0	0	0	n b	n b
3	11.2 V	5.800	17	17	52	590	36.000
4	5.8 V	6.200	18	45	58	1.020	44.400
5	5.7 M	8.400	55	26	18	2.100	10.700
6	15 M	9.100	50	13	16	1.190	19.100
7	5.9 V	9.800	50	18	9	n b	n b
8	14 M	14.600	75	8	19	280	1.380
9	11 M	16.400	90	43	44	3.500	44.800
10	0.7 M	20.600	80	18	33	630	33.500
11	5.0 M	20.800	70	17	16	780	48.600
12	4.0 V	24.000	100	18	16	130	3.610
13	2.6 V	25.400	83	24	33	100	2.840
14	3.0 V	35.000	98	21	13	460	22.400
15*	10.0 M	36.500	98	8	6	280	2.880
16	3.8 M	60.200	95	17	7	120	360
17	5.0 M	95.400	95	16	78	290	2.110
18	22 M	106.000	100	38	17	n b	n b
19	6.2 V	165.000	100	13	11	2.400	2.500
20	2.0 V	300.000	100	28	37	n b	n b

Voorlaring zie tabel VI-3\* — rechute A L L

LAC — B rozettentest waarden bij normale kinderen 25-44%

SRBC — T rozettentest waarden bij normale kinderen 42-72%

19 onbehandelde patiënten en een patiënt met een rechute (patiënt 15). Bij 12 (9 t.m. 20) patiënten lijkt, gezien het hoge percentage lymfoblasten, alleen deze celsoort onderzocht te zijn. Bij de overigen is met uitzondering van patiënt 2, niet te zeggen welke celsoort verantwoordelijk is voor de rozettenvorming. Opvallend zijn onze uitkomsten bij patiënten 9 t.m. 20 in die zin, dat de leukemische cellen per patiënt in wisselende mate E- of T-rozetten (6-78%), maar ook EAC of B-rozetten (8-43%) kunnen vormen.

#### 4.3. Onderzoek bij patiënten lijdende aan A.M.L.

PHA stimulatie werd nagegaan bij 27 onbehandelde patiënten, 9 jonger dan 15 jaar, de overigen adolescenten en volwassenen (tabel VI-9). Slechts 3 maal was het percentage leukemische cellen minder dan 16%. Evaluatie van de PHA stimulatie is dus slechts bij uitzondering mogelijk gebleken en lijkt gezien de leeftijden (patiënt 1: 66 jaar, patiënt 2: 45 jaar) als normaal beschouwd te mogen worden (Catalona c.s. 1973). Bij 5 patiënten: 10, 13, 17, 23 en 25, allen met merendeels leukemische cellen in het bloed, lijkt toevoeging van PHA aan de kweek tot een duidelijke stimulatie aanleiding te hebben gegeven.

TABEL VI-9 PHA-stimulatie bij onbehandelde A.M.L.

Patiënt	leeftijd geslacht	Totaal WBC/mm <sup>3</sup>	$\frac{\text{LBC}}{\text{LBC}+\text{Ly}} \times 100$	- PHA	+ PHA
1	66 M	1.300	6	1.065	18.570
2	45 V	2.150	16	2.520	13.500
3	2,5 M	4.700	50	2.460	44.100
4	62 M	8.200	44	71.300	68.200
5	25 V	8.700	83	12.320	7.490
6	15 M	8.700	15	6.830	70.900
7	2,7 M	8.600	55	980	12.400
8	12 M	10.600	75	38.270	19.500
9	36 M	12.000	100	7.700	10.500
10	7,0 V	15.000	72	11.900	35.600
11	33 V	20.700	90	13.120	16.750
12	12 V	21.800	90	104.000	84.300
13	10 V	36.000	100	2.700	11.200
14	39 V	41.000	85	3.040	3.650
15	52 M	49.000	96	34.680	45.520
16	27 V	53.400	95	22.030	21.970
17	33 M	56.400	90	8.690	31.350
18	51 M	64.000	100	23.600	66.100
19	20 M	65.000	92	6.650	8.450
20	36 M	65.000	95	27.600	27.000
21	7,0 M	128.000	96	60.000	13.400
22	57 V	130.000	96	78.000	61.900
23	21 M	160.000	100	6.200	16.400
24	57 V	240.000	100	72.300	41.800
25	3,7 M	250.000	100	2.560	31.600
26	34 M	270.000	100	63.690	50.290
27	3,3 V	300.000	100	4.470	3.340

Verklaring: zie tabel VI-3

Veel frappanter is o.i. de zeer hoge mate van incorporatie van  $^3\text{H}$ -thymidine, die reeds gezien wordt zonder toevoeging van PHA aan de kweek (vergelijk ook tabellen VI-5 en VI-9).

Ook in tabel VI-10 waarbij naast de stimulatieresultaten met PHA ook die van de PMW stimulatie en de controlekweek zijn vermeld, is dit beeld van de blanco-waarden geheel anders dan het beeld van de vrijwel ongeveer zuiver lymfoblastaire celkweeken (zie tabel VI-5, tabellen VI-6 en VI-7, onderste blokken).

TABEL VI-10 PHA- en PWM-stimulatie bij onbehandelde A.M.L.

Patient	Leeftijd geslacht	totaal WBC/mm <sup>3</sup>	LBC LBC+Ly $\times 100$	controlekweek		+ PHA		+ PWM	
				72 uur	144 uur	72 uur	144 uur	72 uur	144 uur
1	66 M	1 300	6	1 065	490	18 570	5 360		
2	45 V	2 150	16	2 520	3 760	13 500	10 560		
4	62 V	8 700	83	12 320	5 790	7 400	9 000		
8	12 M	10 600	75	38 270	38 350	18 500	35 550		
14	39 V	41 000	85	3 040	1 260	3 650	1 130		
15	52 M	49 000	96	34 680	10 270	45 520	12 260		
17	33 M	56 400	90	8 690	12 970	31 350	26 080		
21	70 M	128 000	96	60 000	31 800	13 400	4 450		
26	34 M	270 000	100	63 690	23 490	50 200	29 110		
27	33 V	300 000	100	4 470	8 800	3 340	10 300		

Verklaring zie tabel VI-3

De patientencijfers corresponderen met die van tabel VI-9.

Op deze discrepantie in het gedrag van leukemische cellen afkomstig van A.L.L. patiënten enerzijds en die afkomstig van A.M.L. patiënten anderzijds zal later worden teruggekomen.

## 5. BESPREKING VAN DE RESULTATEN DER ONDERZOEKEN VERMID SUB 4, MEDE IN HET LICHT VAN LITERATUURGEGEVENS

Het is niet goed mogelijk deze onderzoeken onder één noemer te brengen. O.i. zijn hier drie aspecten die afzonderlijk besproken moeten worden:

- 5.1. de reactie van normale lymfocyten op PHA en PWM stimulatie.
- 5.2. de reactie van lymfoblasten op PHA en PWM-stimulatie en de capaciteit tot het vormen van zogenaamde T- of B-rozetten.
- 5.3. de reactie in vitro van leukemische myeloïde cellen versus het gedrag van leukemische lymfoblasten.

In feite zijn immers de gegevens sub 4.2.1., 4.2.2. en 4.3. qua betekenis en interpretatie niet direct onderling samenhangend, wat uit het onderstaande zal blijken.

### 5.1. De reactie van normale lymfocyten ten opzichte van PHA en PWM

Over de stimulatie van bloed-lymfocyten vóór de behandeling van de acute leukemie zijn slechts weinige studies bekend.

Een van de problemen bij het bestuderen van de eigenschappen van de

lymfocyten in dit ziektestadium, is de aanwezigheid van vele leukemische cellen in het perifere bloed. Bij de door ons onderzochte patiënten was het absolute aantal en het percentage leukemische cellen slechts zelden – bij 14 van de 55 A.L.L. en 3 van de 27 A.M.L.-patiënten – zo laag, dat evaluatie van de lymfocyten betrouwbaar mogelijk was.

Het is o.i. niet reëel om te denken, dat betrouwbare scheidingstechnieken toepasbaar kunnen zijn bij die patiënten waarbij het totaal aantal leucocyten meer dan 50.000/mm<sup>3</sup> is en waarbij het percentage leukemische cellen 70-100% is.

Strikt genomen is het niet afdoende bewezen, dat die patiënten met weinig of geen leukemische cellen aan exact dezelfde ziekte lijden als de hyperleukemische patiënten. Opvallend is immers, dat sommige A.L.L. patiënten ook bij de rechutes géén overmaat leukemische cellen in het bloed hebben, indien dit bij het begin van de ziekte óók ontbrak.

In 1972 vermelden wij (de Vaan c.s. 1972) de enkele studies van Astaldi c.s. (1966) en Kourilsky c.s. (1966) over de PHA-stimuleerbaarheid van normale lymfocyten bij onbehandelde acute leukemie. Sindsdien zijn er eigenlijk géén studies gepubliceerd over dit onderwerp. Hersh c.s. (1971) vermelden de stimulatie door PHA bij onbehandelde A.M.L. O.i. zijn hun vermeldingen onbetrouwbaar omdat, juist bij de A.M.L., het bloed bijna steeds zeer veel leukemische cellen bevat: in ons onderzoek bij 24 van de 27 onderzochte patiënten (tabel VI-9).

Bij 13 van de 14 door ons onderzochte A.L.L. patiënten (tabel VI-3) bleek de PHA-stimulatie normaal te zijn, wanneer men de leeftijden van de patiënten in aanmerking neemt, was deze ook normaal te noemen bij de 3 onderzochte A.M.L. patiënten die slechts een gering percentage leukemische cellen in het bloed hadden.

Zonder twijfel is een normale reactie op PHA een onvoldoende argument om aan te nemen dat de immuniteit normaal is. Nadere karakterisering met bijvoorbeeld rozetten-technieken, reactie op memory-antigenen en dergelijke ware daarbij noodzakelijk.

De immuunglobulinespiegels zijn bij patiënten met een onbehandelde leukemie normaal. Dit blijkt uit literatuurgegevens en uit ons eigen onderzoek bij 30 patiënten, allen kinderen, vermeld in Hoofdstuk III. Op grond van deze gegevens en die van de PHA-stimulatie vermeld in dit hoofdstuk, lijkt het ons niet onjuist om te veronderstellen dat bij de onbehandelde leukemie de immuniteit niet afwijkend is.

Onze bevindingen, vermeld in tabel VI-4, betreffende de PHA-stimulatie van mengsels van lymfocyten en leukemische lymfoblasten zijn moeilijk als argument te beschouwen. Het is immers totaal onmogelijk om na te gaan welke celsoort, de normale of de leukemische, in welke omvang heeft bijgedragen tot de gevonden stimulatie.

De opvatting dat leukemische cellen niet kunnen bijdragen, is immers onjuist gebleken (zie 5.2., zie tabel VI-5). Deze tabel laat duidelijk zien dat het absoluut noodzakelijk is om op te geven wát men heeft onderzocht. Publicaties waarbij men dat niet heeft gedaan zoals die van Astaldi Jr. (1974) zijn nutteloos en wekken slechts verwarring. O.i. zijn onze gegevens echter

in dit kader wel vermeldenswaard, omdat hieruit blijkt, dat inderdaad bij een groot deel van de patiënten slechts oninterpreteerbare gegevens te verkrijgen zijn.

*5.2. De reactie van lymfoblasten op PHA- en PWM-stimulatie en de capaciteit tot het vormen van zogenaamde T- of B-rozetten*

In tabel VI-5 en VI-6 worden de resultaten vermeld van de PHA- respectievelijk PHA- en PWM-stimuleerbaarheid van leukemische lymfoblasten. Dit zijn dus steeds onderzoeken bij patiënten met een zeer hoog percentage leukemische cellen en meestal ook een zeer hoog absoluut aantal leucocyten.

Het is niet onmogelijk, dat in vivo het absolute aantal circulerende bloed-lymfocyten redelijk normaal was; in vitro wordt echter steeds per vast aantal lymfocyten plus maligne cellen de stimulatie door mitogenen berekend. In dit in vitro mengsel is het percentage normale lymfocyten bij deze reeks onderzoeken gering tot vrijwel nihil. O.i. mag derhalve de gevonden <sup>3</sup>H-thymidine incorporatie op het conto van de leukemische cellen worden geboekt. Bij ons weten is dit de grootste gepubliceerde serie en het is duidelijk dat in vele, maar niet alle gevallen de leukemische cellen bij A.L.L. patiënten stimuleerbaar zijn door PHA. Dit is o.i. zeker duidelijk het geval ten aanzien van PHA bij de patiënten 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 en 12 (tabel VI-5). In mindere mate wordt dit gezien bij de hyperleukemische vormen: een geringe stimuleerbaarheid vergeleken met de controleweek is aantoonbaar bij de patiënten 17, 19, 21 en 24. Ook ten tijde van de rechute blijven de leukemische cellen bij 3 van 8 waarnemingen stimuleerbaar (tabel VI-7). Het aantal waarnemingen waarbij naast PHA ook PWM als mitogeen is gebruikt, is te gering om een oordeel mogelijk te maken; wel is het zo, dat de stimulatie door PWM nooit een tegengesteld resultaat had aan dat van stimulatie door PHA.

O.i. mogen wij aannemen, dat leukemische lymfoblasten van patiënt tot patiënt wisselend stimuleerbaar zijn door PHA, waarbij de stimulatie bij de hyperleukemische vormen meestal ontbreekt. Een wisselend hoge stimuleerbaarheid van leukemische lymfoblasten is ook aangetoond door Astaldi (1972) in beenmergcellen en door Melief c.s. (1973) in bloedcellen. Onze onderzoeken, alleen bij A.L.L. patiënten waarbij van de rozetten-technieken gebruik werd gemaakt, lijken qua uitkomsten hierbij te passen (tabel VI-8). Bij 11 van de onderzochte patiënten was het percentage leukemische cellen 75-100%. Opvallend is immers, dat het % T-rozetten zeer wisselt: van 8 tot 43%. Onze resultaten zijn wat anders dan die vermeld in 3.4. (v.s.); daar wordt meestal vermeld, dat de meeste patiënten aan een zogenaamd nultcelluleukemie lijden en slechts een minderheid aan een zogenaamd T-lymfocyt leukemie lijdt. Borella en Sen (1974) menen, dat in die gevallen de leukemie een oorsprong in de thymus heeft. Catovsky c.s. (1974) menen, dat de twee door hen onderzochte patiënten aan een bijzonder type acute (lymfoblastaire) leukemie hebben geleden. De resultaten van Kersey c.s. (1974) sluiten meer aan bij onze bevindingen: zij vinden in de leukemische populatie een wisselend percentage met dit T-

lymfocyt kenmerk, maar bovendien een wisselend percentage dat in staat is om EAC of B-rozetten te vormen (zie ook Gajl-Peczalsky c.s. 1974).

Voor het ook door ons vastgestelde vermogen van leukemische cellen om EAC-rozetten te vormen, hebben wij geen goede verklaring. Roitt (1974) wijst erop, dat een deel van de normale T-lymfocyten bij activiteit een Fc- receptor vertonen. Of zij door deze Fc-receptor dan ook EAC-rozetten kunnen vormen blijft de vraag.

Geactiveerde lymfocyten vormen stabielere rozetten (pers. mededeling Gmelig Meyling 1975); bij onze rozetten-testen bij leukemische cellen was ons opgevallen, dat de gevormde rozetten stabielere zijn dan die gevormd door normale lymfocyten. Een en ander betekent, dat het vermogen om EAC-rozetten te vormen, mogelijk ook bij geactiveerde T-lymfocyten/leukemische cellen aanwezig kan zijn.

In tabel VI-8 zijn ook de resultaten vermeld van de PHA stimulatie; o.i. ontbreekt de correlatie tussen de resultaten van de rozetten-vorming en de resultaten van de PHA-stimulatie. Deze twee fenomenen verlopen kennelijk niet evenwijdig en lijken bij deze leukemische cellen onderling in verschillende mate aantoonbaar te zijn.

Hoe moeten wij nu onze resultaten interpreteren?

De A.L.L. lijkt één ziektebeeld te zijn met een wisseling in kwantitatieve verschijnselen bij het debuut. Deze kwantitatieve wisseling berust zeker ten dele op vertragingen in het stellen van de diagnose. Zowel bij hyperleukemische en ten aanzien van het bloed aleukemische vormen wordt, althans bij het debuut, dezelfde reactie op prednison of prednison en L-asparaginase gezien (de Vaan c.s. 1971). O.i. zijn er onvoldoende argumenten om op dit moment te mogen spreken van zeer bijzondere subtypen zoals Catovsky c.s. (1974) en Kaplan c.s. (1974), Borella en Sen (1974) suggereren. Indien de gebruikte technieken inderdaad specifiek zijn voor T-lymfocyten, wat voor de zogenaamde T-rozetten-techniek zeker wel geldt en in mindere mate voor de PHA-stimulatie techniek, menen wij deze resultaten als volgt te moeten verklaren. Hoewel het niet bewezen is dat PHA alléén T-lymfocyten stimuleert, is het wel zeer aannemelijk dat vooral die celsoort gevoelig is voor de mitogene invloed van PHA (Smith en Haegert 1974, Collins c.s. 1974).

Waarom is deze reactiviteit van lymfoblasten zo wisselend van patiënt tot patiënt? Wanneer men de literatuurgegevens (zie paragraaf 3.4.) overziet en ook de hier vermelde onderzoekresultaten waarbij van rozetten technieken gebruik is gemaakt, blijkt dat bij de meeste patiënten slechts een deel van de lymfoblasten: van 5 tot 70%, T-rozetten kunnen vormen. Het is derhalve niet onredelijk te veronderstellen, dat de afwezigheid van de PHA-stimulatie c.q. de verlaging ten opzichte van normale lymfocyten verklaarbaar kan zijn door aan te nemen dat:

a. slechts een deel van de lymfoblasten bij elke patiënt gevoelig is voor PHA.

b. en/of deze gevoelige cellen hyporeactief zijn.

Bij de C.L.L. is de reactie op PHA verminderd en vertraagd (Bouroncle c.s. 1969). Een enkele maal hebben wij dit nagegaan, maar deze ver-

traagde reactie hebben wij niet bij de A.L.L.-cellen waargenomen. Hoewel wij onze mening nog niet kunnen bewijzen, lijkt het ons juister om aan te nemen, dat bij A.L.L. de prolifererende cel een onrijpe lymfocyt is en dat het onjuist is om te spreken van een 'nulcel' A.L.L. enerzijds en een T-cel A.L.L. anderzijds.

Onze argumenten zijn de volgende:

1. Klinisch is er geen verschil aangetoond in wijze van debuut, therapiegevoeligheid en dergelijke tussen de 'nulcel' en de T-cel A.L.L. Het verzamelen van gedifferentieerde gegevens kan in de toekomst misschien wel verschillen opleveren.

2. De term acuut betekent, i.t.t. chronisch, dat er een proliferatie van onrijpcellige elementen is; het is daarom niet te verwachten, dat alle kenmerken van de uitgerijpte lymfocyt in gelijke mate aanwezig zijn. Dit is bijvoorbeeld wel het geval ten aanzien van de aanwezigheid van immuunglobulinen op de lymfocyten bij de C.L.L.

3. Bij de A.L.L. zijn twee geneesmiddelen werkzaam die géén cytostatica zijn en bij andere maligne celwoekeringen geen of nauwelijks effect hebben. Het betreft het prednison en het L-asparaginase. Corticosteroiden zijn bij de mens cytolytisch voor rijpende lymfocyten en weinig werkzaam tegen rijpe lymfocyten (Craddock c.s. 1971). Fauci en Dale (1974) toonden aan, dat met name hydrocortison bij de mens wel een tijdelijke lymfopenie veroorzaakt, maar dat gezien de snelheid waarmee deze na het staken van deze therapie verdwijnt meer op een redistributie dan op een cytolyse moet berusten. Het L-Asparaginase heeft duidelijk een negatief effect op normale, rijpe T-lymfocyten (Ohno en Hersh 1970). Deze gegevens zijn een argument voor de verwantschap tussen leukemische lymfoblasten en de normale lymfocyt. Noch L-asparaginase noch corticosteroiden hebben een beenmerg deprimerende werking. Het is daarom onwaarschijnlijk, dat zij een schadelijke werking op ongedifferentieerde stamcellen hebben. De A.L.L. blijft bij elke terugval cytologisch onveranderd; wanneer stamcellen leukemisch zouden worden, zou men mogen verwachten, dat een wisselende mate van uitrijping in de richting van de erythropoïese of granulocytopoïese behouden blijft, c.q. af en toe wordt waargenomen. Bij de rechute van de A.M.L. vonden wij bijvoorbeeld wel, dat een aanvankelijk zuiver granulocytuleukemisch beeld later gevolgd werd door een meer erythroleukemisch beeld.

4. Bij de A.L.L. wordt steeds waargenomen, dat na een 'leegworden' van het beenmerg bij de remissie-inductie dit weer bevolkt wordt door normale elementen: dit kan verklaard worden door aan te nemen dat niet de stamcellen leukemisch zijn, maar de leukemische lymfoblasten om onbekende redenen een kinetisch 'voordeel' hebben in de groei, vergeleken met de zich differentiërende nakomelingen van de stamcellen. Deze krijgen hun kans weer nadat de leukemische populatie gereduceerd is door de antilymfoblastaire therapie.

Om deze redenen menen wij de A.L.L. als volgt te mogen omschrijven: een aandoening waarbij in het beenmerg een woekering optreedt van on-



rijpcellige lymfocyten. Hierbij kunnen elders in het lichaam, direct of later, ook ophopingen optreden van dezelfde celsoort.

De tijd zal moeten leren of er verband bestaat tussen de mate waarin T- (of B-) lymfocyt-kenmerken aanwezig zijn en bijvoorbeeld de leeftijd van debuut, lymfeklierzwellings, lever- en miltvergroting en dergelijke. Mogelijk kan door gebruik van meerdere 'markers' zoals Brown c.s. (1974) hebben gedaan ook meer differentiatie ten deze worden bereikt.

Men mag stellen dat stamcellen ongedifferentieerd zijn en geen enkel kenmerk vertonen van de vier grote reeksen nakomelingen (erythrocyten, granulocyten, lymfocyten en monoccyten). Elke celsoort heeft zijn eigen kenmerkende eigenschap: dat van de rijpende lymfocyt zal dan waarschijnlijk een of andere vorm van immunocompetentie zijn. De zich uitrijpende lymfocyt zal nog niet de invloed van een immunogeen hebben ondergaan. In dit verband kan ook gememoreerd worden, dat bij die patiënten waarbij de A.L.L. debuteert met een grote mediastinale tumor, deze patholoog-anatomisch géén thymus-tumor blijkt te zijn. (de Vaan en Vooy's 1970). Dit bevestigt nog eens de opvatting, dat de A.L.L. niet in de thymus debuteert. Indien de aanwezigheid van immuunglobulinen op de B-lymfocyt inhoudt dat deze 'gevoelig' zijn voor bepaalde antigenen en het dus rijpe lymfocyten zijn, past de bevinding dat deze membraan gebonden immuunglobuline nooit op A.L.L.-cellen wordt aangetroffen (zie tabel VI-2) ook in onze hypothese.

De etiologische afscheiding van het lymfoblastaire maligne lymfoom, dat bij kinderen zo vaak in een leukemie overgaat, wordt hierdoor ook mogelijk. Zeer waarschijnlijk gaat het daarbij om woekering van rijpe T-lymfocyten, waarvan de meerderheid bij gezonde personen zich buiten het beenmerg bevindt (Trepel 1974). Opvallend is immers, dat dezelfde onderzoekers bij A.L.L. slechts in een deel van leukemische patiënten T- (of B-) lymfocyt kenmerken vinden, terwijl dit bij de door hen onderzochte maligne lymfomen constanter gevonden werd (zie paragraaf 3.2. en 3.3.).

Wanneer de antileukemische therapie bij de A.L.L. na enkele jaren ononderbroken gegeven te zijn, wordt gestaakt, treedt een zogenaamd immunologische rebound op (Borella c.s. 1972, Green en Borella 1973). Hierbij ziet men een uitgesproken lymfocytose van het beenmerg volgens deze auteurs optreden. Ook wij hebben deze lymfocytose herhaaldelijk kunnen waarnemen. Opvallend is, dat deze rebound niet gepaard gaat met lymfklier of miltvergroting. O.i. kan dit fenomeen verklaard worden door aan te nemen dat de (her)opbouw van het lymfoide systeem bij deze kinderen en bij jonge normale zuigelingen gepaard gaat met een 'influx' van nieuwe lymfocyten, die rechtstreeks uit beenmergstamcellen ontstaan. Bij beide categorieën kinderen gaat de ontwikkeling c.q. herstel van het lymfoide systeem dus gepaard niet zozeer met proliferatie van lymfocyten in milt en lymfklieren, maar door aanmaak vanuit het beenmerg. Deze gegevens wijzen dus nogmaals op de primaire rol van het beenmerg bij de opbouw van het immunologische systeem. Deze lymfocyten/lymfoide cellen hebben geen stamcelfunctie (Baccarani c.s. 1972).

### 5.3. *De reactie in vitro van leukemische myeloïde cellen versus het gedrag van leukemische lymfoblasten*

Het is uiteraard niet verwonderlijk, gezien ook de herkomst van de door ons onderzochte patiënten, dat dit overwegend volwassenen zijn. De indruk die wij hebben van onze klinische ervaringen bij kinderen is even deprimerend als die door internisten verkregen wordt door hun ervaringen met volwassenen. Klinisch lijkt het er niet op, dat de A.M.L. bij kinderen een ander verloop heeft dan bij volwassenen. Mogelijk is de levensduur na het stellen van de diagnose wat langer (Spiers 1972).

O.i. lijkt er geen wezenlijk onderscheid te zijn: de remissie lukt slechts zelden, langdurige aplasieën worden eveneens vaak gezien. Dit komt ook tot uiting in het gedrag in vitro van de myeloïde leukemische cellen: er lijken in dit opzicht ook geen wezenlijke verschillen te bestaan tussen volwassenen en kinderen. Deze inleiding tot de bespreking van onze onderzoeken lijkt ons nodig om op voorhand de gedachte weg te nemen dat de door ons gevonden verschillen tussen de A.L.L. en A.M.L. terug te voeren zijn op leeftijdsverschillen van de overwegend jonge A.L.L. en overwegend volwassen A.M.L. patiënten. Uit de tabellen VI-5, 6 en 7 blijkt, dat de lymfoblasten vrijwel steeds een lage tot zeer lage opname vertonen van  $^3\text{H}$ -thymidine in de controlekweken. De leukemische myeloïde cellen tonen eigenlijk steeds een zeer grote spontane opname, zowel na 3- als na 6-daagse kweken (tabel VI-9 en 10).

Om deze verschillen nog eens te accentueren, waarbij dan naar het resultaat van de dag blanco-kweek wordt gekeken:

bij de 24 A.L.L. patiënten op tabel VI-5 is de  $^3\text{H}$ -thymidine inbouw in cpm/500.000 cellen  $17 \times < 1000$ ,  $5 \times : 1000 - 4000$  en slechts  $2 \times$  hoger: nl. 7.900 en 8.190.

Bij de controlekweken van de A.M.L. patiënten (tabel VI-9) blijkt, dat met uitzondering van de patiënten 1, 2 en 6, het % leukemische cellen steeds zeer hoog; 44-100%, te zijn. Bij deze 24 patiënten was het aantal cpm/500.000 cellen slechts  $1 \times < 1000$  (patiënt 7)  $10 \times : > 1000 - 10.000$ , waarvan:  $5 \times < 5000$  en  $5 \times > 5000 - 10.000$ . Bij de overige 14 was de uitslag steeds  $> 10.000$  tot veel meer! Dit patroon van de lage en hoge incorporaties bij respectievelijk A.L.L. en A.M.L. is ook bij de 6 daagse controlekweken van A.L.L. (tabel VI-6) en A.M.L. (tabel VI-10) terug te vinden.

Opgemerkt moet worden, dat bij een aantal A.L.L. patiënten met een hyperleucocytose en een lage incorporatie het aantal blasten in het perifere bloed op prednison alléén reeds zeer snel daalde. Omdat lang uitstellen van de therapie niet wenselijk lijkt, werd bij elke A.M.L. en A.L.L. patiënt slechts éénmaal bloed afgenomen voor kweek. Slechts een enkele maal waren er gegevens bekend over het aantal leukemische cellen 4-10 dagen vóór deze proef. Bij de A.L.L. patiënten 20, 22 en 24 was dit het geval. Patiënt 20 had 10 dagen eerder 10.000 leucocyten/mm<sup>3</sup>, patiënt 22 : 145.000/mm<sup>3</sup> en patiënt 24 : 270.000/mm<sup>3</sup> in het bloed. Deze waarnemingen zijn echter te weinig talrijk om conclusies toe te laten.

O.i. zijn deze verschillen dermate opvallend dat voor een nadere differentieel diagnostiek tussen A.L.L. en A.M.L. deze celkweken een aanwinst

kunnen worden. Volgens Beard en Hamilton Fairly (1974) is het immers nog steeds bij  $\pm 10\%$  van alle patiënten niet mogelijk om door morfologisch en histochemisch onderzoek tot zekere diagnose ten aanzien van het celtype te komen.

Waarop berust dit frappante verschil?

Van lymfocyten is bekend dat zij nucleotiden van dode cellen kunnen herbenutten. (Craddock c.s. 1964, Feinendegen c.s. 1966). Terloops zij opgemerkt dat niet bekend is of ze intacte brokstukken DNA, dat wil zeggen genetische informatie, kunnen opnemen.

Het thymidine van dode en stervende cellen kan in vitro de endogene pool vergroten, waardoor relatief minder radio-actief gemerkt thymidine wordt opgenomen (Hartog c.s. 1967). Suspensies van gehomogeniseerde leucocyten kunnen bovendien veel thymidine fosforylase bevatten (Marsh c.s. 1964); dit enzym breekt het aanwezige ongemerkte en gemerkte thymidine af, waardoor de gemeten opname laag wordt. Bij de experimenten van Marsh c.s. (1964) werd echter een overmaat homogenaat aan de levende cellen toegevoegd.

Wij hebben bij onze waarnemingen steeds een vitaal kleuring met trypaanblauw gedaan en daarbij is gebleken dat na 72 uur en na 144 uur het percentage levende cellen bij beide leukemietypen hoog, 70-95% was. O.i. kunnen de lagere incorporatiewaarden bij A.L.L. dan ook niet hierdoor worden verklaard.

Schumacher c.s. (1969) vonden met een autoradiografische methode dat myeloïde cellen een hogere labelling-index vertoonden dan lymfoblasten. De verschillen waren echter niet buitensporig en er bestond een brede marge van overlapping tussen de twee leukemietypen. Walker c.s. (1973) hebben bij hun twee onderzochte patiënten ook een hoge mate van  $^3\text{H}$ -thymidine-opname gevonden in niet gestimuleerde celkweken van A.M.L. patiënten.

Verdere onderzoekingen, door ons (Bakkeren c.s. 1975) in 1974 begonnen, wijzen er op, dat de hoge graad van  $^3\text{H}$ -thymidine incorporatie, gemeten na 3 dagen incubatie in vitro, gepaard gaat aan een hoog percentage cellen in de DNA-synthesefase, gemeten door middel van impulsctyofotometrie van dezelfde in vitro gekweekte celpopulaties. Het omgekeerde blijkt ook op te gaan: bij een lage opname van  $^3\text{H}$ -thymidine wordt met laatstgenoemde techniek een kleinere fractie cellen gevonden in de DNA-synthesefase. Nadere uitwerking van deze gegevens valt buiten het kader van dit proefschrift.

Onverklaarbaar is dat de cellen van enkele A.M.L. patiënten gekweekt met toevoeging van PHA, een duidelijke toename van de incorporatie lieten zien (patiënten 10, 13, 17, 23 en 25 tabel VI-9). Deze 5 patiënten hadden geen of weinig normale lymfocyten in de kweek. Patiënt 13 is in zoverre merkwaardig, dat zij met een typische A.L.L. therapie vlot in remissie kwam. Was in dit geval de morfologisch-histochemische diagnose onjuist?

## CONCLUSIE

Zowel uit de gegevens van andere onderzoekers als uit onze eigen resultaten blijkt, dat de neoplastische cel bij de acute lymfoblastaire leukemie in wisselende mate kenmerken vertoont, behorende bij de rijpe lymfocyt. Men mag aannemen dat ook lymfocyten zich uit ongedifferentieerde stamcellen ontwikkelen en het is redelijk om te stellen dat de eerste fasen van de rijping in het beenmerg plaats vinden. Een leukemogene invloed op deze jonge stadia zal leiden tot een acute leukemie van het lymfoblastaire type. Het lijkt o.i. op dit moment redelijk om de acute lymfoblastaire leukemie als volgt te definiëren: een woekering van onrijpe lymfocyten die in de beenmergfase van hun rijping een leukemische verandering hebben ondergaan.

Om deze hypothese verder te staven of te ontzenuwen ware het wenselijk dat meer bekend is over de kenmerken van de ontwikkelingsstadia van de normale stamcel tot de rijpe lymfocyt. De kenmerken van de rijpe T- en B-lymfocyt zijn immers wel bekend, vrijwel niets is bekend over de mate waarin en de volgorde van verschijnen van deze 'markers' bij de in het beenmerg rijpende lymfocyt. Wij beseffen zeer wel, dat onze onderzoeken in dat opzicht geen informatie bieden. Een aanwijzing voor de juistheid van de hier voorgestelde definitie is onze bevinding van een wisselend hoog % EAC of B-rozetten. Het is mogelijk dat dit een kenmerk is voor geactiveerde lymfocyten. Anderzijds kan dit er ook op wijzen dat de leukemische lymfoblast enigszins het vermogen behoudt om zowel in de richting van T- als B-lymfocyt uit te rijpen. In ieder geval gaat dit dan vrijwel nooit zover dat membraan-gebonden immuunglobuline op de cel aanwezig is. (zie 3.3.). Zoals er dus uitgaande van rijpe B-lymfocyten een reeks maligne aandoeningen kunnen ontstaan (Salmon en Seligmann 1974) en de rijpe (?) T-lymfocyt aanleiding kan geven tot het non-Hodgkin maligne lymfoom, nemen wij hier dus aan dat bij de A.L.L. de neoplastische cel een onrijpe, beenmerg 'prolymfocyt' is.

Het systematisch onderzoeken van zowel A.L.L. als A.M.L.-patiënten blijkt een gelukkige keuze te zijn geweest. Hierdoor waren wij in staat, om althans in vitro, zeer opmerkelijke verschillen aan te tonen tussen deze twee leukemietypen. Het celkinetische onderzoek door middel van impuls-cytofotometrie van beenmergcellen (Bakkeren c.s. 1975) heeft bevestigd, dat soortgelijke verschillen tussen A.M.L. en A.L.L. als in de leukemische cellen van het bloed ook opgaan voor de leukemische cellen van het beenmerg.

De prognose van de A.L.L. is veel beter dan van de A.M.L. Uit onze waarnemingen blijkt dat, althans in vitro, leukemische lymfoblasten minder intensief groeien. Mogelijk treedt bij deze ziekte meer een ophoping op van leukemische cellen, waardoor normale stamcellen wegens 'plaatsgebrek' in het beenmerg niet kunnen uitrijpen. Bij de A.M.L. lijkt de celgroei ongebreidelder te zijn, mogelijk zijn daarbij zelfs de stamcellen leukemisch geworden (Killman 1968). Het lijkt derhalve de vraag of de naam acute stamcel-leukemie voor A.L.L. niet een geheel onjuiste is, maar meer past bij de A.M.L. of sommige vormen daarvan.

Indien bij de A.L.L. vooral een cumulatie van zich niet meer delende cellen zou optreden blijft het merkwaardig, dat deze zich vaak zo gemakkelijk door cytostatica laten vernietigen. Een bezinning op het quasi dogma dat zich delende cellen het meest gevoelig zijn voor cytostatica, lijkt naar aanleiding van onze waarnemingen bij zowel de A.L.L. als A.M.L. gerechtvaardigd.

## METHODIEKEN

## CELSCHIEDING EN LYMFOCYTENSTIMULATIE TEST

20 ml perifeer bloed werd afgenomen en vermengd met heparine-oplossing zonder conserveringsmiddel tot een eindconcentratie van 100 I.E./ml. Aan het bloedmonster werd vervolgens 1/5 volume 5% dextraan (mol. gew. 200.000) toegevoegd. De erythrocyten werden dan gesedimenteerd door 30-60 min. bij 37° C te incuberen. Het leucocytenrijke plasma werd afgepipetteerd. Hierna werd een zuivere lymfocytensuspensie bereid door het plasma via incubatie op nylonwatten te ontdoen van granulocyten en monoccyten. Hiertoe werd het plasma op een nylonwatten-kolom (Filtralon) gebracht, die tevoren uitgewassen was met achtereenvolgens: 1% 7-X-detergens, een fosfaat-gebufferde zoutoplossing (PBS) met 0,1% EDTA en met Earle's zoutoplossing (BSS). Na 30 min. incuberen bij 37° C werden de lymfocyten van de kolom gespoeld met BSS, die 20% foetaal kalfsserum bevatte. De aldus verkregen lymfocytensuspensie werd vervolgens 12 min. gecentrifugeerd bij 200 x g en 1 x uitgewassen met BSS. De cellen werden dan geresuspendeerd in 1 ml Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) en geteld in een haemocytometer. De celsuspensie bevatte gemiddeld 98-99% lymfocyten. De opbrengst aan lymfocyten bedroeg 30-40%.

In die gevallen, waar in het perifeer bloed de lymfocyten en/of leukemische cellen meer dan 70% van het totale aantal leucocyten vormden, werd de bereiding van een zuivere lymfocytensuspensie via nylonwatten achterwege gelaten en werd het leucocytenrijke plasma direct gebruikt.

Voor de lymfocytenstimulatie test werd de celconcentratie op  $5 \times 10^5$  lymfocyten en/of leukemische cellen in 1 ml kweekmedium gebracht. Het kweekmedium bestond uit: MEM (Flow) versterkt met glutamine (2mM) en foetaal kalfsserum (10%) (Flow), waaraan streptomycine (100 µg/ml) en penicilline (100 E/ml) waren toegevoegd. Als mitogeen werden toegevoegd: PHA (PHA-P, Difco) (1 µl/ml kweekmedium) of PWM (GIBCO) (20 µl gereconstitueerde vloeistof/ml kweekmedium).

De incubaties werden, met en zonder mitogeen, in triplo uitgevoerd. Met PHA als mitogeen werd gedurende 3 dagen gekweekt bij 37° C in een vochtige atmosfeer van 5% CO<sub>2</sub> in lucht; met PWM werd gedurende 6 dagen gekweekt. Aan ieder monster werd 4 uur vóór het beëindigen van de kweek 1 µCi 3H-thymidine (spec. act. 24 Ci/mmol) in 0,05 ml fysiologisch zout toegevoegd. De cellen werden 4 uur later afgefilterd op een Millipore filter (Microfiber Disc prefilters), uitgewassen met fysiologisch zout, geprecipiteerd met koude 5% trichloorazijnzuur en tenslotte werd de oplosbare radio-activiteit met gedestilleerd water uitgespoeld. Na 30 min. drogen bij 90° C werden de filters overgebracht in telpotjes, bevattende

10 ml scintillatievloeistof (5 g 2,5 - diphenyloxazol (PPO) + 100 mg 2-phenyleen - bis (4-methyl-5-phenyloxazol (dimethyl-POPOP) in 1 l toluen). De radio-activiteit werd geteld in een vloeistofscintillatieteller (Nuclear Chicago Mark I). De resultaten werden uitgedrukt in cpm per  $5 \times 10^5$  cellen. Voor stimulatie met specifieke antigenen werd geen gebruik gemaakt van zuivere lymfocytensuspensies, maar werd het leucocytenrijke plasma, verkregen na dextraan-sedimentatie, rechtstreeks gebruikt. De kweekperiode bedroeg bij de antigenen 6 dagen. De antigenen werden toegevoegd in de volgende concentraties: *Candida albicans* (Hollister Stier) (1 : 10) : 0,02 ml; difterie-toxoid (R.I.V.) (1,3 Lf/ml) : 0,05 ml; tetanus-toxoid (R.I.V.) 1,2 Lf/ml) : 0,05 ml.

#### VITALE KLEURING

Het percentage levende cellen werd bepaald met behulp van de trypaan-blauwexclusie-methode.

#### ROZETTENTESTEN

De rozettentesten werden uitgevoerd volgens de methode van Stjernswärd et al (1972).

#### BEREIDING VAN DE LYMFOCYTENSUSPENSIE

Voor de bereiding van de lymfocytensuspensie werd gebruik gemaakt van de Ficoll-Isopaque evenwichts-dichtheid centrifugatiemethode van Böyum (1968), zoals beschreven door du Bois et al (1973). Veneus bloed werd gedefibrineerd door 10 min. te schudden met glasparels (1 parel per 2 ml bloed). Na het defibrineren werd het bloed verdund met een gelijk volume Eagle's MEM voor suspensiekweken (MEM-S) (Flow), waarin de bicarbonaatbuffer was vervangen door 0,025 M Trisbuffer. Bovendien was nog penicilline (100 E/ml) en streptomycine (100 µg/ml) toegevoegd. Voor de celscheiding werd gebruik gemaakt van een mengsel van Ficoll (mol. gew. 400.000 Pharmacia, Uppsala, Zweden) en Isopaque (440 mgJ/ml) (Pharmachemie, Haarlem).

Tien delen Isopaque (33,9 g%) werden gemengd met 24 delen Ficoll (9g%), zodat het uiteindelijke soortelijk gewicht 1,077 g/ml bedroeg.

8 ml verdund bloed werd nu voorzichtig op 4 ml Ficoll-Isopaque-mengsel gebracht in een Falcon weefselkweekbuis. Er werd 20 min. bij 1000 x g gecentrifugeerd, bij kamertemperatuur.

Na centrifugeren bevatte de laag op het scheidingsvlak van de twee vloeistoffen de mononucleaire cellen (lymfocyten en monocyten) en het precipitaat de granulocyten en erythrocyten. De lymfocytenlaag werd voorzichtig verwijderd met een Pasteurse pipet en 2 x gewassen met MEM-S plus 5% AB-serum en geteld in een haemocytometer.

#### E-ROZETTEN-TEST

De schape-erythrocyten werden bij 4° C bewaard in Alsever's oplossing (1:1) gedurende niet langer dan een week. Vóór gebruik werden de cellen 2 x gewassen met fysiologisch zout. 0,25 ml van een 1% schape-erythro-

cytensuspensie werd nu gemengd met 0,25 ml van de bovengenoemde lymfocytensuspensie, die  $4 \times 10^6$  cellen per ml bevatte. Deze gemengde celsuspensie werd gedurende 15 min bij  $37^\circ \text{C}$  geïncubeerd, vervolgens gedurende 2 min bij  $200 \times g$  en  $4^\circ \text{C}$  gecentrifugeerd en gedurende de nacht in ijs geïncubeerd. Het grootste deel van de bovenstaande vloeistof werd daarna afgezogen en de bovenste laag van het celprecipitaat door voorzichtig met de hand te schudden geresuspendeerd. Een druppel van de celsuspensie werd op een objectglaasje gebracht, bedekt met een dek-glaasje, dat met nagellak werd vastgekleefd. 200 lymfocyten werden geteld en alle cellen, die meer dan 3 schape-erythrocyten binden, werden als positief voor E-rozettenvorming gerekend. Op deze wijze werd het percentage E-rozetten vormende lymfocyten berekend.

#### EAC-ROZETTENTEST

Een 5% schape-erythrocytensuspensie werd bereid op dezelfde wijze als beschreven voor de E-rozettentest. 5 ml van deze suspensie werd gedurende 30 min bij  $37^\circ \text{C}$  geïncubeerd met 5 ml amboceptor (konijne-anti-schape-erythrocytenserum) (R I V), dat 1:2000 verdund was met BSS. De cellen werden daarna gecentrifugeerd, 3 x gewassen met fysiologisch zout en geresuspendeerd in 5 ml BSS.

Vervolgens werd aan de suspensie 5 ml humaan complement (humaan serum 1:20 verdund met BSS) toegevoegd en weer 30 min bij  $37^\circ \text{C}$  geïncubeerd. De cellen werden tenslotte weer afgecentrifugeerd en 3 x gewassen met fysiologisch zout. De celsuspensie werd uiteindelijk op 1% in BSS gebracht, 0,25 ml van de op deze wijze geprepareerde schape-erythrocytensuspensie (EAC) werd gemengd met 0,25 ml van de  $4 \times 10^6$  cellen per ml bevattende lymfocytensuspensie. Het celmengsel werd gedurende 2 min bij  $200 \times g$  gecentrifugeerd en vervolgens 15-30 min bij kamertemperatuur geïncubeerd.

Het merendeel van de bovenstaande vloeistof werd afgepipetteerd en de cellen geresuspendeerd door hard te mengen op een Vortex-mixer. Een druppel van de celsuspensie werd vervolgens op een objectglaasje gebracht en de EAC-rozetten geteld als beschreven voor de E-rozetten.

#### TIJDSTIP VAN BLOEDAFNAME

Om variatie t.g.v. een eventueel dagritme uit te sluiten werden alle bloedmonsters afgenomen tussen 9.00 en 12.00 uur v.m. en binnen 1-2 uur na de venapunctie verwerkt.

#### KWANTITATIEVE BEPALINGEN VAN IMMUUNGLOBULIËNEN, $\alpha_1$ -ANTITRYPSINE EN HAPTOGLOBINE

Deze werden uitgevoerd met behulp van de enkelvoudige radiale immunodiffusie methode volgens Mancini c.s. (1964) in een vereenvoudigde modificatie volgens van Munster en Stoelinga (1965).

#### DIFTFRIG-ANTITOXINE BEPALINGEN

Proeven uitgevoerd door Mej. J. P. M. Moons, Laboratorium voor Me-



dische Microbiologie, Nijmegen, volgens methode R.I.V. Bilthoven; neutralisatiereactie in weefselkweek (BSC-1-cellen).

**TETANUS-ANTITOXINEBEPALINGEN:**

Proeven uitgevoerd in het Medisch Biologisch Laboratorium TNO te Rijswijk door de afdeling van Dr. H. C. Bartlema; passieve haemagglutinatietechniek met behulp van getanneerde schape-erythrocyten.

## CHAPTER I

GENERAL CONSIDERATIONS ON THE AETIOLOGY OF ACUTE  
LEUKAEMIA

A general survey of the literature is given. It is stressed that in man the precise aetiology and pathogenesis of leukaemia are still far from completely known. Preexisting chromosomal abnormalities increase the risk of acute leukaemia. Chromosomal abnormalities are actually rare, with the exception of Trisomy 21. It is said that in Trisomy 21 the risk to develop leukaemia of childhood is increased 20 fold. However such an increase of other malignant diseases in this group of patients is unknown. Ionising radiation seems to play actually a minor role in the aetiology of acute leukaemia in childhood. This may depend on the general custom to limit X-rays exposure during pregnancy as much as possible. Hereditary factors predisposing to acute leukaemia do not seem to be very strong: leukaemia in sibs of children is very rare.

A viral aetiology is not very clearly suggested by epidemiological studies. In man a viral aetiology or a viral causative factor is not yet fully proven. Moreover the way by which an eventual leukaemogenic virus causes acute leukaemia is far from clearly known.

Leukaemia antigens are to a great extent cell-proliferation dependent antigens which are not specific for leukaemia itself. Whatever the nature of these antigens may be, in A.L. patients they play only a minor role in the defense against the uncontrollable leukaemic growth. In congenital immunodeficiency syndromes the risk to develop malignant disease is increased. It is stressed that in these disorders the risk for malignant lymphoma is highly increased, much more than the risk to develop leukaemia.

## CHAPTER II

POSSIBLE RELATIONSHIP BETWEEN IMMUNOLOGICAL  
DYSFUNCTION AND THE PATHOGENESIS OF ACUTE LEUKAEMIA

This chapter deals especially with the possible relationship between immunological factors and the development of A.L.L. in childhood. Congenital immunodeficiency and iatrogenic immunosuppression seem to increase the chance of developing malignant lymphoma but to a much lesser extent the chance of developing A.L.L.

The age incidence of A.L.L. is quite distinct from the age incidence of malignant lymphoma, both of the non-Hodgkin and Hodgkin type. A.L.L. is actually a disease occurring mostly in young children, after the age of 20-30 years it is a very rare disease; A.M.L. on the other hand is rare in children, but the incidence increases steadily with age.

By scrutinizing the data from our own A.L. patients it became clear that they did not differ from healthy children as regards handling of infections or vaccinations received before they developed A.L. Nor was the incidence of infections higher with the exception of the short period before the diagnosis of A.L. was made. With respect to immunity, children who develop A.L. must be considered not to differ from children who remain healthy.

The typical type of leukaemia of childhood is the acute lymphoblastic type (A.L.L.), this type being rare in adolescents and almost absent in adults above 30-40 years of age. A tentative hypothesis is developed to explain the high incidence of this particular leukaemia type in previously normal young children and to explain also the rarity of this disease in older patients. The immunological memory is built up to a very great extent during early youth. Exactly this period of life coincides with the highest incidence of A.L.L. From the data reported in chapter VI it is known that the malignant cell in this leukaemia-type is actually a rather immature lymphocyte. It is suggested that errors – with or without the action of oncogenic viruses – during memory-formation may lead to the development of A.L.L.

### CHAPTER III

#### IMMUNOLOGICAL AND INFECTIOUS FACTORS IN CHILDREN BEFORE THE DEVELOPMENT OF A.L.

From the literature no impression is gained that maternal factors, acting during or after pregnancy, play a major role in the development of A.L. of childhood. Neither birth-order, the incidence of miscarriages or infections stand out as important. However it seems quite sure that a viral infection e.g. influenza of the pregnant mother significantly increases the chance for the child to develop A.L. However more prospective studies are needed to confirm this.

There is no reason to believe that A.L. is secondary to certain infections. A relationship between A.L. and the Epstein-Barr virus is doubtful.

From our own data and from the results of a survey of the literature one can conclude that in children who develop A.L. there are no primary disturbances in both cellular and humoral immunity. The chance that some subtle disturbance is present seems to be ruled out, as our own group of 124 patients appeared generally normal in an immunological respect prior to the diagnosis of A.L. Moreover as these disturbances could be due to hereditary errors of immunity, one would expect the same disturbance to be present in a great part of the sibs of the affected children. In that case however, the probability that sibs would develop A.L. should be much higher than the reported incidence of about 1 in 500-700.

As far as immunity can be studied at the time of diagnosis or during treatment, it seems that both the humoral and the cell mediated part of it are fundamentally normal. The memory acquired before or during the disease never disappears.

## CHICKENPOX AND HERPES ZOSTER DURING ANTILEUKAEMIC THERAPY

In the foregoing chapters we came to the conclusion that in A.L. presenting in childhood there is no evidence for an intrinsic abnormality in the immune mechanisms. The altered response to infectious agents is therefore due to the immunosuppressive effects of antileukaemic treatment, especially during remission.

As a clinical example of how the immune response is altered by this therapy, our observations of varicella-zoster virus infections in children under treatment are here reported. As chickenpox is a primary infection, changes in the course of the disease are not influenced by preexisting specific immunity.

Chickenpox almost always runs a more severe course in these children. However, rather mild disease is often seen, as this cannot be predicted, great caution is always necessary. After surveying the literature on this subject, the therapeutic effects of cytosine-arabioside are to be doubted, the number of personal observations, however, being too small for firm conclusions in this respect.

The good effects of herpes zoster immunoglobulin reported in the literature are confirmed by our own observations.

It is stressed that all antileukaemic therapy should be stopped immediately after the first chickenpox-vesicles develop. One out of 14 children died from the infection. In four children herpes zoster was observed, this is quite rare in healthy children and the occurrence must also be ascribed to antileukaemic therapy.

## CHAPTER V

## IMMUNOSUPPRESSION BY ANTILEUKAEMIC THERAPY, ATTEMPTS OF QUANTIFICATION

In the foregoing chapter, it was shown that a normally innocent infection like chickenpox may give rise to serious and even fatal disease. Dosages of cytostatics are adjusted normally in accordance with the degree of bone-marrow depression as expressed by the peripheral blood. However, good parameters for even fatal degrees of immunosuppression are lacking for the individual patient.

Three types of study were done.

Firstly, PHA stimulation was measured just before and during intensive reinduction courses by rubidomycin, vincristine and prednisone. A clear-cut decrease of PHA responsiveness was observed, together with a definite decrease in circulating lymphocytes during these courses. PHA stimulation remained normal i.e. returned to normal during single-drug maintenance therapy.

Secondly, the effect of a booster vaccination with diphtheria-poliomyelitis-

tetanus antigen was studied. Antibody-titers of diphteria and tetanus toxoid were studied before and after boosting. Moreover the response in vitro of blood lymphocytes to these two antigens was studied at the same moments. In healthy children and adults there proved to be no correlation whatsoever between the four parameters; that is, antibody-titers against two different antigens and the in vitro stimulation by these same two antigens. It is concluded that part of the difficulties of quantitating immunosuppression is the from person to person (and probably from time to time in the same person) widely diverging quantitative differences in an, after all, normal immune response.

Thirdly, the in vitro stimulation of blood lymphocytes by aspecific mitogens (PHA and PWM), memory-antigens (diphteria and tetanus) and a continuously present antigen (*candida albicans*) were studied during anti-leukaemic treatment. This study was started about 11 to 13 weeks after the start of the remission-induction-therapy and 2 to 4 weeks after completion of the additional CNS-leukaemia prophylaxis (cranial irradiation plus intrathecal methotrexate and prednisone).

Cell-cultures were done at the start of the first consolidation-course (two weeks prednisone 1 dd. 40 mg/m<sup>2</sup>, on day 1-8 vincristine 2 mg/m<sup>2</sup>) and furthermore on the 1st, 8th, 22nd and 35th day of the maintenance therapy (6-MP 50 mg/m<sup>2</sup> daily, MTX 30 mg/m<sup>2</sup> once weekly). In half of the patients cyclophosphamide (200 mg/m<sup>2</sup>) was administered on day, 1, 15 and 29 of the maintenance therapy. As to the aspecific mitogens, the results paralleled each other quite well when the results of the same data are compared. The stimulation by these mitogens, as followed through the seven weeks of study turned out to be very different; no apparent relation between type of therapy (vincristine - prednisone and cytostatic maintenance) being present.

The same results were found when the results of stimulation by antigens were compared. So it seems that there is no consistent pattern of the in vitro behaviour of lymphocytes during antileukaemic therapy. The absence of any pattern during this therapy, which is actually also immunosuppressive, becomes more understandable when the results of booster-vaccination are remembered.

In these studies the most striking finding was the fact that in normal healthy persons an adequate immune-response was not accompanied by a fixed pattern of a humoral in vivo and a cellular in vitro response.

In our third study we observed a steady rise of the numbers of circulating neutrophils and lymphocytes during the VCR-prednisone-pulses, followed by a continuous falling in numbers of both cell-types during the ensuing 5 weeks of cytostatic maintenance therapy. In how far this observation can be explained by actual increases of the pool and/or shifts from extravascular to vascular compartments is not known at the moment. In the author's opinion the changes during VCR-prednisone therapy are so high, that a shift from one compartment to the other seems to be insufficient to account for the observed changes.

# THE NATURE OF THE PROLIFERATING CELL IN A.L.L.; CELL-KINETIC DIFFERENCES BETWEEN A.L.L. AND A.M.L.

A survey of the literature concerning T- and B-lymphocyte markers in C.L.L., malignant lymphoma and A.L.L., is given. It is concluded that malignant proliferation of mature T- and B-lymphocytes is very rare or almost completely absent in children, an exception being made for the malignant lymphoma of the lymphoblastic non-Hodgkin diffuse type. Our own studies concern the stimulation by PHA and PWM, the E- and EAC-rosette forming capacity of lymphocytes and/or leukaemic cells in A.L.L. before any treatment (55 cases) or at relapse (21 studies in 16 patients).

## 1 Results of PHA/PWM stimulation in A.L.L.

In 14 patients the peripheral blood contained none or hardly any leukaemic cell at the start of therapy. The stimulation of these lymphocytes turned out to be completely normal. In 17 patients the blood contained normal lymphocytes and a substantial percentages of leukaemic cells in these 17 patients we measured the stimulation of both cell-types. To what extent each of these cell-types apart played a role in the stimulation remains an unanswered question. In 24 patients the peripheral blood contained an almost pure population of leukaemic cells and an insignificant percentage of normal lymphocytes. In about half of these 24 cases the leukaemic cells responded to PHA, the response could not be due to normal lymphocytes. They responded always less than normal lymphocytes.

2 In relapsing A.L.L. (21 observations in 16 patients) the same results were observed.

It must be said that the initial clinical response to antileukaemic therapy did not seem to differ whether the leukaemic cells did or did not respond to PHA.

## 3. Results of E- and EAC-rosette formation in untreated A.L.L.

In the literature it is reported that in about 25% of the cases, leukaemic lymphoblasts can form E-rosettes. In our 12 patients the percentage of leukaemic cells in the blood was so high that the rosette-forming capacity of leukaemic cells could be asserted. It is stressed that the percentage of E-rosettes being formed differs very much from patient to patient: 5 to 75%. Moreover these rosettes were more stable than those from normal lymphocytes. Quite remarkable was our finding that this leukaemic cell-type can also form E.A.C. rosettes in a from patient to patient differing percentage. In how far this is due to a Fc receptor which is present in normal activated T-lymphocytes is not known.

## 4 Results of PHA and PWM stimulation in A.M.L.

27 patients were investigated: normal lymphocyte function could be ascertained only in 3, in the other 24 patients the absolute number and percentage of leukaemic myeloid cells was so high that assesment of normal lymphocyte function was impossible. In some of the cases A.M.L.-leukaemic cells actually responded to PHA and PWM. The most striking

result was the almost uniform high incorporation of the label in the control cultures without added mitogen. In control cultures of pure suspensions of A.L.L.-leukaemic cells the incorporation of the label was generally low to extremely low. It is concluded that these observed differences can be used as a new real aid in the differential diagnosis between A.M.L. and A.L.L. This had not been reported elsewhere.

From the literature and also from our studies in cases of A.L.L., one can conclude that the proliferating cell in A.L.L. is an immature 'prolymphocyte' destined to differentiate towards a lymphocyte but arrested in its maturation.

It is believed that bone-marrow cells in a very early stage of maturation towards the lymphoid series become leukaemic; in our view the aetio-pathogenesis is entirely different in A.M.L.: in that disease uncommitted stem-cells become leukaemic and retain more or less the capacity to differentiate in a myeloid or even in an erythroid direction. The lack of long lasting bone-marrow aplasia during remission-induction of A.L.L. in contrast to the very often fatal iatrogenic aplasia of A.M.L. is a strong clinical argument for this hypothesis.

- ACITO, T, G D BECKHORN, J M MATTIMORE, AND F M KENNY Cortisol secretion in children with varicella or rubella *Am J Dis Child* 1969, **117**, 294-298
- ASINBERG, A C, K J BLOCH, AND J C LONG Cell-surface immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia and allied disorders *Am J Med* 1973, **55**, 184-191
- ASINBERG, A C, K J BLOCH, J C LONG AND R B COLVIN Reaction of normal human lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia cells with an antithymocyte antiserum *Blood* 1973, **41**, 417-423
- ATFXANDER, P F-escape from immune destruction by the host through shedding of surface antigens is this a characteristic shared by malignant and embryonic cells *Cancer Res* 1974, **34**, 2077-2082
- ASTALDI, JR A, A MARTINI AND I MASSIMO Membrane immunofluorescence in acute lymphocytic leukemia *N Engl J Med* 1974, **290**, 1438
- ASTALDI, G, I MASSIMO, R AIRO, AND P G MORI Phytohaemagglutinin and lymphocytes from acute lymphocytic leukaemia *Lancet* 1966, **1**, 1265-1266
- ASTALDI, G, I MASSIMO, F DAGNA, P G MORI, AND A FOSSATI PHA-blastogenesis in relationship to cell-type and source in acute leukemia *Blut* 1972, **24**, 153-160
- BACCARANI, M, AND S A KILMANN Evidence against human bone marrow lymphocytes being committed haemopoietic stem cells *Scand J Haemat* 1972, **9**, 339-342
- BACH, J F Bases cellulaires de la production des anticorps *Nouvelle Presse Med* 1972, **1**, 1221-1224, 1357-1361, 1431-1434
- BACH, M I, F H BACH, AND P JOO Leukaemia Associated Antigens in the mixed leukocyte culture test *Science* 1969, **166**, 1520-1522
- BAKKEREN, J A J M, G A M DE VAAN, AND F D A M SCHRETELN Phytohaemagglutinin stimulation of peripheral lymphocytes in children with acute lymphoblastic leukemia during remission *Scand J Haemat* 1972, **9**, 36-42
- BAKKEREN, J A J M, H F P HILLEN, EN G A M DE VAAN Cel-kinetische aspecten van de leukemische cellen bij A L I en A M L Voordracht *Ned Ver Kinderen Deventer*, 15-3-1975
- BATCHELOR, J R, J H EDWARDS, AND J STUART Histocompatibility and acute lymphoblastic leukaemia *Lancet* 1971, **1**, 699
- BATHS, H A, R O BAKOIE, AND W R SWAIM Immunofluorescence studies in human leukaemia *Blood* 1969, **34**, 430-440
- BAXT, W, J W YATAS, H J WAITACE, J F HOLLAND, AND S SPIEGELMAN Leukemia-specific DNA sequences in leucocytes of the leukemic member of identical twins *Proc Nat Acad Sci USA* 1973, **70**, 2629-2632
- BEARD, M F J AND G HAMILTON FAIRLEY Acute leukaemia in adults *Sem Hemat* 1974, **11**, 5-24
- BELPOMME, D, D DANTCHEV, E DU RUSQUEC, D GRANDJON, R HUCHET, P POLIART, I SCHWARZENBERG J I AMIEL, AND G MATHE T and B lymphocyte markers on the neoplastic cells of 20 patients with acute and 10 patients with chronic lymphoid leukemia *Biomedicine* 1974, **20**, 109-118
- BENTWICH, Z, AND H G KUNKEL Specific properties of human B and T lymphocytes and alterations in disease *Transpl Rev* 1973, **16**, 29-50
- BERNARD, J, M BOIRON, C JACQUILLAT, AND M WEIL Les très longues remissions complètes des leucémies aigues *Actualites Hematol* 1973, **7**, 3-9
- BERNHIM, M, F IARBRE, C MOURIQUAND, AND D GERMAIN Deux cas de vancelle hemorrhagique a evolution mortelle chez deux enfants traites à la cortisone pour maladie de Bouillaud *Pediatric* 1956, **11**, 920-924
- BIRNSTEIN, I D Immunologic defences against cancer *J Ped* 1973, **83**, 906-918
- BILUMINK, F, J P NATER, H SCHRAFFORD KOOPS, AND T H THF A standard method for DNCB sensitization testing in patients with neoplasms *Cancer*, 1974, **33**, 911-915
- BODFY, G, E MCKELVEY, AND M KARON Chickenpox in leukemic patients - factors in prognosis *Pediatrics*, 1964, **34**, 562-564



- BORITIA, I., A. A. GREEN, AND R. G. WEBSTER. Immunological rebound after cessation of long term chemotherapy in acute leukemia *Blood*, 1972, **40**, 42-51.
- BORITIA, I., AND I. SEN. T cell surface markers on lymphoblasts from acute lymphocytic leukemia *J Immunol* 1973, **111**, 1257-1260.
- BORITIA, I., AND I. SEN. The distribution of lymphocytes with T- and B-cell surface markers in human bone marrow. *J Immunol*, 1974, **112**, 836-843.
- BORITIA, I., AND R. G. WEBSTER. The immunosuppressive effects of longterm combination chemotherapy in children with acute leukemia in remission. *Cancer Res* 1971, **31**, 420-426.
- BOURONCLE, B. A., K. P. KLAUSSEN, AND J. F. ASCHENBRAND. Studies of the delayed response of the phytohaemagglutinin (PHA) stimulated lymphocytes in 25 chronic lymphatic leukemia patients before and during therapy *Blood*, 1969, **34**, 166-178.
- BOYER, J. La leucémie aigüe de l'enfant et le sarcome de Burkitt, ne sont-ils que des complications rares d'infections inévitables passant généralement inaperçues? *Sem Hôp. Paris*, 1973, **49**, 3085-3092.
- BOYUM, A. Separation of leucocytes from blood and bonemarrow. *Scand J Clin and Lab Invest* 1968, **21**, suppl. 97, 1-109.
- BROUIT, J. C., J. I. PREL'D'HOUME, M. SEIGMANN, AND J. BERNARD. Blast cells with monoclonal surface immunoglobulin in two cases of acute blast crises supervening on chronic lymphocytic leukemia. *Brit Med J* 1973, **3**, 23-24.
- BROWN, G., M. F. GREAVES, T. A. HESTER, N. RAPSON, AND M. PAPAMICHAEL. Expression of human T and B lymphocyte cell surface markers on leukaemic cells. *Lancet*, 1974, **2**, 753-755.
- BROWNING, D., AND S. GROSS. Epidemiological studies of acute childhood leukemia. *Am J Dis Child* 1968, **116**, 576-585.
- BRUGSCH, H. *Handbuch der Kinderheilkunde*. Band V, Infektionskrankheiten. Springer Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg. 1963, 79-91.
- BRUN, F. Die kutan-allergische Spatreaktion auf 2, 4-dinitrochlorbenzol bei Krebspatienten unter zytostatischer Therapie. *Schweiz Med Wschr.*, 1971, **101**, 1235-1245.
- BRUNFELT, P. A., A. ROSS, I. H. MILLER, AND B. KLO. Prevention of varicella by zoster immune globulin *New Engl J Med*. 1969, **280**, 1191-1194.
- BURNET, F. M. Cellular Immunology Melbourne University Press, Cambridge University Press, 1970.
- BUTLER, N. R. The epidemiological approach to intrauterine infections in. 'Intrauterine infections' *Ciba Foundation Symposium*, 1973, **10**, 151-163.
- CAMPBELL, A. C., P. HERSEY, I. C. M. MCLENNAN, H. E. M. KAY, AND M. C. PIKE. Immunosuppressive consequences of radiotherapy and chemotherapy in patients with acute lymphoblastic leukaemia *Brit Med J* 1973, **2**, 385-388.
- CATALONA, W. J., W. F. SAMPLE, AND P. B. CRETEN. Lymphocyte reactivity in cancer patients: correlation with tumor histology and clinical stage *Cancer*, 1973, **31**, 65-71.
- CATOVSKY, D., J. GAFFETTO, A. OKOS, D. A. G. GALTON, E. WILTSHAW, AND G. STATHOPOULOS. Prolymphocytic leukaemia of B and T cell type. *Lancet*, 1973, **2**, 232-234.
- CATOVSKY, D., F. MILIANI, A. OKOS, AND D. A. G. GALTON. Clinical significance of T cells in chronic lymphocytic leukaemia *Lancet*, 1974, **2**, 751-752.
- CATOVSKY, D., J. M. GOLDMAN, A. OKOS, B. FRISCH, AND D. A. G. GALTON. T lymphoblastic leukaemia, a distinct variety of acute leukaemia *Brit. Med. J.* 1974, **2**, 643-646.
- CHANDRA, R. K. Serum Immunoglobulin levels in children with acute lymphoblastic leukaemia and their mother and sibs. *Arch Dis Childh* 1972, **47**, 618-620.
- CHIN, A. H., J. H. SAIKI, J. M. TRUJILLO, AND R. C. WILLIAMS JR. Peripheral blood T- and B-lymphocytes in patients with lymphoma and acute leukemia. *Clin Immunol Immunopathol* 1973, **1**, 499-510.
- COLLINS, R. D., J. L. SMITH, G. P. CLEIN, AND C. R. BARKER. Absence of B- and T-cell markers on acute lymphoblastic leukaemic cells and persistence of the T-cell marker on mitogen transformed lymphocytes. *Brit. J. Haemat* 1974, **26**, 615-625.
- CRADDOCK, C. G., G. S. NAKAI, H. FUKUTA, AND L. M. VANSLAGER. Proliferative activity of the lymphoblastic tissues of rats as studied with tritium-labelled thymidine *J. Exper Med* 1964, **120**, 389-412.

CRADDOCK, C. G., R. LONGMIRE, AND R. MC MILLAN. Lymphocytes and the immune response. *New Engl. J. Med.* 1971, **285**, 324-331, 378-384.

CROWTHIR, D., R. J. POWERS, C. J. T. BATEMAN, M. E. J. BEARD, C. I. GAUCI, P. F. M. WRIGLEY, J. S. MALPAS, G. HAMILTON FAIRLEY, AND R. BODLEY SCOTT. Management of adult acute myelogenous leukaemia *Brit. Med. J.* 1973, **1**, 131-137.

DAMESHUK, W., F. GUNZ, in: 'Leukemia' Ed. Grune and Stratton, New York en London. 1958, 37.

DAVIS, C. M., J. V. VANDIRSARI, AND C. A. COITMAN. Failure of cytarabin in varicella-zoster infections. *JAMA*, 1973, **224**, 122-123

DEGOS, I., AND J. DAUSSAT. Le système HL-A et la susceptibilité aux maladies. *Actualités Hématologiques*. 1972, **6**, 235-252.

DIAMOND, F. I., H. SCHMERLER, AND A. M. LILINFELD. The relationship of intrauterine radiation to subsequent mortality and development of leukemia in children. *Am J Epidemiol* 1973, **97**, 283-313.

DICKITER, H. B., N. F. ADKINSON, JR., R. I. FISHER, AND W. D. TERRY. Lymphocytes in patients with variable immunodeficiency and panhypogammaglobulinemia. *J Clin Invest* 1974, **53**, 834-840.

VAN DER DOES-VAN DEN BERG, A., (namens S.N.W.L.K.). Leukemie bij kinderen in Nederland, resultaten van een enquête onderzoek. *NTvG* 1975, **119**, ter perse.

DORE, J. F., I. MARHOUDY, H. COIAS DE LA NOUE, F. DE VASSAL, R. MOTTA, I. HRSAK, G. SEMAN, AND G. MATIIF. New antigens in human leukaemic cells and antibody in the serum of leukaemic patients. *Lancet*, 1967, **2**, 1396-1398.

DUPUY, J. M., F. M. KOURILSKY, D. FRADELLIZZI, N. FEINGOLD, C. JACQUILLAT, J. BERNARD, AND J. DAUSSET. Depression of immunologic reactivity of patients with acute leukaemia. *Cancer*, 1971, **27**, 323-331

EILMAN, I., I. GREEN, AND W. J. MARTIN. Histocompatibility genes, immune responsiveness, and leukaemia. *Lancet*, 1970, **1**, 1104-1106.

ELVES, M. W. 'The lymphocytes', 2e ed 1972 Ed. Lloyd-Luke Ltd, London.

EVANS, D. I. K. Immune response in families of children with acute lymphoblastic leukaemia. *Arch. Dis. Childh* 1973, **48**, 441-445

FAHEY, J. L., AND D. R. BOGGS. Serum protein changes in malignant diseases. I The acute leukemias. *Blood*, 1960, **16**, 1479-1490

FALK, H., C. W. HEATH, D. J. FERNBACH, AND J. M. FALETTA. Incidence of childhood leukaemia. *Lancet*, 1973, **2**, 862.

FALLIERS, C. J., AND E. I. FLLIS. Corticosteroids and Varicella. *Arch. Dis. Childh* 1965, **40**, 593-599.

FALCI, A. S., AND D. C. DALE. The effect of in vivo hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1974, **53**, 240-246.

FEINENDEGEN, I. E., V. P. BOND, AND W. L. HUGHES. Physiological thymidine reutilization in rat bone marrow *Proc Soc Exp Biol and Med.* 1966, **122**, 448-455.

FERNBACH, D. J. in W. W. Sutow, T. J. Vietti, D. J. Fernbach. *Clinical Pediatric Oncology*. Ed. C. V. Mosby Company, Saint Louis, 1973, 153-166.

FINKEL, K. C. Mortality from varicella in children receiving adrenocorticosteroids and adrenocorticotropin. *Pediatrics*, 1961, **28**, 436-441.

FIANDRIN, G., J. C. BROUET, M. T. DANIEL, AND J. I. PRUD'HOMME. Acute leukemia with Burkitt's tumor cells. a study of six cases with special reference to lymphocyte surface markers *Blood*, 1975, **45**, 183-188.

FOERSTER, J., AND W. HRYNIUK. Cytosin arabinoside and herpes-zoster. *Lancet*, 1971, **2**, 712.

FOLB, P. I., AND J. R. TROUNCE. Immunological aspects of Candida infection complicating steroid and immunosuppressive drug therapy *Lancet*, 1970, **1**, 1112-1114.

FORTUNY, I. G., R. WEISS, A. THEOLOGIDIS, AND B. J. KENNEDY. Cytosine arabinoside in herpes zoster *Lancet*, 1973, **1**, 38.

FRAUMENI, J. F. JR. Constitutional disorders of Man predisposing to leukemia and lym-

- phoma *VCI Monographs* 1968, **32**, 221-232
- IRAJMINI, J. I., AND F. P. II Hodgkin's disease in Childhood: an epidemiological study *J Nat Cancer Inst* 1969, **42**, 681-691
- IRAJMINI, J. I. Clinical epidemiology of leukemia *Sem Hemat* 1969, **6**, 253-263
- IRIUND, R., U. RAUFER, EN W. H. HITZIG Quantitative Immunoglobulinbestimmungen im Laufe langdauernder zytostatischer Therapie *Mtschr Kinderheilk* 1969, **117**, 563-568
- IRIDMAN, W. H., AND F. M. KOURILSKY Stimulation of lymphocytes by autologous leukaemic cells in acute leukaemia *Nature* 1969, **224**, 277-279
- GALLO, R. C., S. S. YANG, AND R. C. TING RNA dependent DNA polymerase of human acute leukaemic cells *Nature* 1970, **228**, 927-929
- GATTI, R. A., AND R. A. GOOD Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases *Cancer* 1971, **28**, 89-98
- GAJI-PECZALSKA, K. J., C. D. BLOOMFIELD, M. E. NESBIT, AND J. H. KERSEY B-cell markers on lymphoblasts in acute lymphoblastic leukaemia *Clin Exp Immunol* 1974, **17**, 561-569
- GEORGE, S. I., D. J. HIRNBACH, T. J. VIETTI, M. P. SULLIVAN, D. M. IANF, M. F. HAGGARD, D. H. BERRY, D. LONSDALE, AND D. KOMP Factors influencing survival in pediatric acute leukaemia *Cancer* 1973, **32**, 1542-1553
- GERSHON, A. A., P. A. BRUNELL, AND F. F. DOYLF Steroid therapy and varicella *J Pediatrics* 1972, **81**, 1034
- GERSHON, A. A., S. STEINBERG, AND P. A. BRUNELL Zoster immune globulin, a further assessment *New Engl J Med* 1974, **290**, 243-245
- GIRSHWIN, M. F., AND A. D. STEINBERG Loss of suppressor function as a cause of lymphoid malignancy *Lancet* 1973, **2**, 1174-1176
- GIBSON, R. W., I. D. J. BROSS, S. GRAHAM, A. M. LIEFENFELD, I. M. SCHULMAN, M. I. LEVIN, AND J. F. DOWD Leukemia in children exposed to multiple risk factors *New Engl J Med* 1968, **279**, 906-909
- GIBSON, R. W., AND S. GRAHAM Epidemiology of long-term survival in acute leukemia *New Engl J Med* 1974, **290**, 583-587
- GRANGER, G. A. Lymphokines - the mediators of cellular immunity *Series Haemat* 1972, **5**, 8-40
- GREEN, A. A., AND I. BORFHA Immunologic rebound after cessation of long-term chemotherapy in acute leukemia II In vitro response to phytohemagglutinin and antigens by peripheral blood and bone marrow lymphocytes *Blood*, 1973, **42**, 99-110
- GREEN, S. S. AND K. W. SHI Mixed leukocyte stimulation of peripheral leucocytes by autologous lymphoblastoid cells *Science* 1970, **170**, 989-990
- GREENE, W. H., S. G. SCHIMPF, AND P. H. WERNIK Cell-mediated immunity in acute nonlymphocytic leukemia: relationships to host factors, therapy and prognosis *Blood* 1974, **43**, 1-14
- DE GRUCHY, G. C. Clinical haematology in medical practice Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1966, 2e ed., 2e druk
- GUTTERMAN, J. U., F. M. HERSH, G. M. MAVIGIT, E. J. FRIEDREICH, R. D. ROSSER, W. T. BUTLER, K. B. MCCREDIE, G. P. BODDY, AND V. RODRIQUEZ Cell-mediated and humoral immune response to acute leukemia and soluble leukemia antigen - Relationship to immunocompetence and prognosis *NCI Monogr* 1973, **37**, 153-165
- HAGGERTY, R. J., AND R. C. EIFY Vancella and Cortisone *Pediatrics*, 1956, **18**, 160-161
- HALL, T., C. WILFERT, N. JAFFE, D. TRAGGIS, S. LUX, P. ROMPF, AND S. KATZ Treatment of vancella-zoster with cytosine arabinoside *Clin Res* 1969, **17**, 470
- HAITERMAN, R. H., B. G. LEVINTHAL, AND D. I. MANN An acute-leukemia antigen correlation with clinical status *New Engl J Med* 1972, **287**, 1272-1274
- HAN, J., AND J. WANG 'Antigenic' disparity between leukaemic lymphoblasts and normal lymphocytes in identical twins *Clin Exp Immunol* 1972, **12**, 171-175
- HARRIS, R., D. VIZA, R. TODD, J. PHILLIPS, R. SUGAR, R. F. JENNISON, G. MARRIOTT, AND M. H. GIBSON Detection of human leukaemia associated antigens in leukaemic serum and normal embryos *Nature* 1971, **233**, 556-557
- HARRIS, R. Leukaemia antigens and immunity in man *Nature* 1973, **241**, 95-100

HARTOG, M., M. J. CLINE, AND G. M. GRODSKY. The response of human leucocyte cultures to stimulation by tuberculin and phytohaemagglutinin measured by the uptake of radioactive thymidine *Clin Exp Immunol* 1967, **2**, 217-228.

HEATH, C. W., AND R. J. HASTRIK. Leukemia among children in a suburban community. *Am J Med* 1963, **34**, 796-801.

HEATH, R. B., G. HAMILTON FAIRLEY, AND J. S. MALPAS. Production of antibodies against viruses in leukaemia and related diseases *Brit J Haemat.* 1964, **10**, 365-369.

HERSH, E. M., P. P. CARBONE, V. G. WONG, AND F. J. FREIREICH. Inhibition of the primary immune response in man by antimetabolites. *Cancer Res.* 1965, **25**, 997-1002.

HERSH, E. M., P. P. CARBONE, AND F. FREIREICH. Recovery of immune responsiveness after drug suppression in man *J. Lab Clin Med.* 1966, **67**, 566-570.

HERSH, E. M., J. U. GUTTERMAN, G. M. MAVRIGIT, K. B. MCCREDIE, M. A. BURGESS, A. MATTHEWS, AND F. J. FREIREICH. Serial studies of immunocompetence of patients undergoing chemotherapy for acute leukemia. *J. Clin. Invest.* 1974, **54**, 401-408.

HERSH, E. M., AND J. J. OPPENHEIM. Inhibition of in vitro lymphocyte transformation tests during chemotherapy in man. *Cancer Res.* 1967, **27**, 98-105.

HERSH, E. M., J. P. WHITCAR, JR., K. B. MCCREDIE, G. P. BODFY, AND E. J. FREIREICH. Chemotherapy, immunocompetence, immunosuppression and prognosis in acute leukemia. *New Engl J Med.* 1971, **285**, 1211-1216.

HOLLAND, J. F., H. SPAN, AND T. BANERJEE. Quantitative studies of localized leucocyte mobilisation in acute leukemia *Blood.* 1971, **37**, 499-511.

HOLWERTZ, J. Cytarabine, een betrouwbaar cytostaticum? *N.T.v.G.* 1974, **118**, 999-1002.

HRYNIAK, W., J. LOFFSTER, M. SHOJANIA, AND A. CHOW. Cytarabin for herpes virus infections *JAMA.* 1972, **219**, 715-718.

HUGGINS, W. T. Fatal infections in childhood leukemia. *Am. J. Dis. Child.* 1971, **122**, 283-287.

HUMPHREY, J. H. AND R. G. WHITE. Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 3de ed 1971, George Thieme Verlag, Stuttgart.

IOANNIDES, A. K., F. ROSNER, M. BRINNER, AND S. L. IFF. Immunofluorescent studies of human leukemic cells with antiserum to a murine leukemic virus (Rauscher strain). *Blood.* 1968, **31**, 381-387.

IVERSEN, T. Leukaemia in infancy and childhood. *Acta Paed Scand* 1966, suppl. 166.

JALFE, F. S., F. M. SHEVACH, M. M. FRANK, C. W. BERARD, AND I. GREEN. Nodular lymphoma - evidence for origin from follicular B lymphocytes. *New Engl. J. Med.* 1974, **290**, 813-819.

JIANNET, M., P. ALBERTO, AND M. WYSS. Antigènes HL-A et affections hématologiques malignes *Schw. Med. Wschr* 1971, **101**, 1798-1800.

JINKIN, R. D. T. The management of malignant lymphomas in childhood in: T. J. DUFFLY. *Malignant diseases in children* Ed. Butterworths, London, 1974, 319-359.

JONDAI, M., H. WIGZELI, AND F. AIUTI. Human lymphocyte subpopulations: classification according to surface markers and/or functional characteristics. *Transplantation Rev* 1973, **16**, 163-195.

JONCAS, J., J. BOUCHER, M. GRANGER-JULIEN, AND C. FILION. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *C.M.A. Journal.* 1974, **110**, 33-37.

JONES, I. H., R. M. HARDISTY, D. G. WELLS, AND H. E. M. KAY. Lymphocyte transformation in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Brit. Med. J.* 1971, **4**, 329-330.

JONIS, S. I., Z. FUKS, M. BULL, M. F. KADIN, R. F. DORFMAN, H. S. KAPLAN, S. A. ROSENBERG, AND H. KIM. Non-Hodgkin's lymphomas. IV Clinicopathologic correlation in 405 cases. *Cancer.* 1973, **31**, 806-823.

JUDISOHN, R. G., J. D. MEYERS, R. J. ELLIS, AND E. K. THOMAS. Efficacy of zoster immune globulin. *Pediatrics.* 1974, **53**, 476-480.

KAPLAN, J., R. MASTRANGELO, AND W. D. PETERSON, JR. Childhood lymphoblastic lymphoma, a cancer of thymus-derived lymphocytes. *Cancer Res.* 1974, **34**, 521-525.

KAY, J. F. M. Incidentie van A.M.L. bij kinderen, pers. mededeling namens M.R.C. Working Party on Leukaemia in Childhood, 1974.

KEITH, L., AND F. BROWN. Epidemiologic study of leukaemia in Twins (1928-1969). *Acta*

KERSFY, J H, B D SPECTOR, AND R A GOOD Cancer in children with primary immunodeficiency diseases *J Pediatrics* 1974, 84, 263-264

KIRSEY, J H, M G NESBIT, J R LUCKASEN, H M HALLGREN, A SABAD, E J YUNIS, AND K J GAJI-PICTZAI SKA Acute lymphoblastic leukemia and lymphoma cells with thymus-derived (T) markers *Mayo Clin Proc* 1974, 49, 584-587

KHALIFA, A S, H TAKE, J CEJKA, AND W W ZUEI ZFR Immunoglobulins in acute leukemia in children *J Pediatrics* 1974, 85, 788-791

KILIMANN, S A Acute leukemia the kinetics of leukemic blast cells in man *Ser Haemat* 1968, 1-3, 38-102

KIRAN, O, AND S GROSS, The G-immunoglobulins in acute leukemia in children Hematology and Immunologic Relationships *Blood*, 1969, 33, 198-206

KIFIN, F The cell surface in immune response *Europ J Cancer*, 1970, 6, 15-22

DE KONING, J, I J DOOREN, D W VAN BEKKUM, J J VAN ROOD, K A DICKE, AND J RADI Transplantation of bone-marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency *Lancet* 1969, 1, 1223-1227

KOLRITSKY, F M, I IOVRIC, AND A LEVACHER Phytohaemagglutinin and lymphocytes from acute leukaemia *Lancet*, 1966, 2, 856-857

KURZ, R Morbus Hodgkin im Kindesalter *Päd und Padol* 1971, 7, 323-335

IANGENHUYSEN, M M A C AND T H THE Epstein-Barr virus in human disease *Neth J Med* 1973, 16, 85-93

IANGENHUYSEN, M M A C Concurrent infectious mononucleosis and acute myelocytic leukemia *Acta Haemat* 1974, 51, 121-127

IAROE, G J Cancer caused by an inherited selective defect in immunological surveillance *Lancet* 1973, 1, 641-643

IAY, W H, N F MENDES, C BIANCO, V NUSSENZWEIG Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes *Nature* 1971, 230, 531-532

IARSON, D I, AND L J TOMLINSON Quantitative antibody studies in man III Antibody response in leukemia and other malignant lymphomata *J Clin Invest* 1953, 32, 317-321

IAWIER, S D, P T KIOLDA, R M HARDISTY, AND M M TILL Histocompatibility and acute lymphoblastic leukaemia *Lancet* 1971, 1, 699

IFADING ARTICLE Infectious mononucleosis and acute leukaemia *Lancet*, 1971, 1, 688

IFADING ARTICLE Oncogenicity of EB virus *Lancet*, 1974, 1, 123-124

IFCK, I, P MORRIS JONES, J K STEWART, D I K EVANS AND H B MARSDEN Childhood leukaemia in Manchester *Lancet*, 1973, 2, 509-510

LIMFRIE, M, R GERARD-MARCHANT, D SARRAZIN, H SANCHO, G TCHERNIA, F HAMANT, J IFMERIE, AND O SCHWEISGUTH Lymphosarcoma and reticulum cell sarcoma in children *Cancer* 1973, 32, 1499-1507

IFVENTHAL, B G, P COHEN, AND S C TRIFM Effect of chemotherapy on the immune-response in acute leukemia *Israel J Med Sc* 1974, 10, 866-887

IIVINE, A S, R G GRAW, JR, AND R C YOUNG Management of infections in patients with leukemia and lymphoma current concepts and experimental approaches *Sem Hemat* 1972, 9, 141-181

IEVINE, A S, S C SCHIMPH, R G GRAW, JR AND R C YOUNG Hematologic malignancies and other marrow failure states progress in the management of complicating infections *Sem Hemat* 1974, 11, 141-202

IIN, P S, A G COOPER, H H WORTIS Scanning electron microscopy of human T cell and B cell rosettes *New Engl J Med* 1973, 289, 548-551

IING, N R *Lymphocyte stimulation* North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1968

IINGEMAN, C H Epidemiologic pathology of leukemias and lymphomas of Man *N C I Monogr* 1968, 32, 177-209

IO CURTO, M, AND B IILZTO PHA short-term culture of lymphocytes in acute leukemia during remission *Acta Haemat* 1971, 45, 337-343

IO GERFO, P, J KRUPFY, AND H J HANSEN Demonstration of an antigen common to several varieties of neoplasia *New Engl J Med* 1971, 285, 138-141

- MANN, D I, G N ROSENTIN, R HAITERMAN, AND B LEVENTHAL Detection of an antigen associated with acute leukemia *Science* 1971, **174**, 1136-1137
- MANCINI, G, J P VALMAN, AND J F HEREMANS A single radial diffusion method for the immunological quantitation of proteins *Prot Biol Fluids*, 1964, **11**, 370
- MARSH, J C, AND S PERRY Thymidine catabolism by normal and leukaemic human leukocytes *J Clin Invest* 1964, **43**, 267-278
- MATHE, G, I SCHWARZENBERG, J L AMIEL, M SCHNEIDER, A CATTAN, AND J R SCHLUMBERGER The role of immunology in the treatment of leukaemias and hematosarcomas *Cancer Res* 1967, **27**, 2542-2553
- MATHE, G, M HAYAT, I SCHWARZENBERG, J L AMIEL, M SCHNEIDER, A CATTAN, J R SCHLUMBERGER, AND C JASMIN Acute lymphoblastic leukaemia treated with a combination of prednisone, vincristine and rubidomycin *Lancet* 1967, **2**, 380-383
- MATHE, G, J L AMIEL, I SCHWARZENBERG, M SCHNEIDER, A CATTAN, J R SCHLUMBERGER, M HAYAT AND F DE VASSAL Demonstration de l'efficacité de l'immunothérapie active dans la leucémie aiguë lymphoblastique humaine *Revue Franç d'études clin biol* 1968, **13**, 454-459
- MCDEVITT, H O, AND W F BODMER HL-A immune response genes and disease *Lancet*, 1974, **1**, 1269-1275
- MCKEIVY, E, AND P P CARBONE Serum immune globulin concentrations in acute leukemia during intensive chemotherapy *Cancer* 1965, **18**, 1292-1296
- MILLER, C J M, M J H SCHWITZER, W P ZYLMAKER, E H VERHAGEN, AND V P EIJSSVOOGEL Some immunological properties of lymphoid cells from patients with acute lymphatic leukaemia *Clin and Exp Immunol* 1973, **15**, 131-143
- MERIGAN, T C Host defences against viral disease *New Engl J Med* 1974, **290**, 323-329
- MLUWISSEN, H J, O STUTMAN, AND R A GOOD Functions of the lymphocytes *Sem Hemat* 1969, **6**, 28-66
- MILLER, G, T SHOPE, L HESTON, R O'BRIEN, A SCHWARTZ, AND H PEARSON Prospective study of Epstein-Barr virus infections in acute lymphoblastic leukemia of childhood *J Pediatrics*, 1972, **80**, 932-937
- MILLER, G The oncogenicity of Epstein-Barr virus *J Infect Dis* 1974, **130**, 187-205
- MILLER, R W Persons with exceptionally high risk of leukemia *Cancer Res* 1967, **27**, 2420-2423
- MILLER, R W, AND N A DALAGER US Childhood cancer deaths by celltype, 1960-68 *J Pediatrics*, 1974, **85**, 664-668
- MOLL, R H Antenatal irradiation and childhood cancer causation or coincidence *Brit J Cancer* 1974, **30**, 199-208
- VAN MUNSTER, P J J AND G B A STOELINGA Over de isolering van immuunglobuline-A (IgA) *Maandschr Kinderen* 1965, **33**, 428-443
- NEDERLANDSE WERKGROEP LEUKEMIE BIJ KINDEREN Gegevens Centraal Bureau, den Haag
- OGRA, P L, I F SINKS, AND D T KARZON Poliovirus antibody response in patients with acute leukemia *J Pediatrics* 1971, **79**, 444-449
- OHNO, R, AND E M HERSH The inhibition of lymphocyte blastogenesis by L'asparaginase *Blood* 1970, **35**, 250-262
- PATTENGALL, P K, R W SMITH, AND F PERLIN T- and B-cell markers of atypical lymphocytes in infectious mononucleosis *New Engl J Med* 1974, **291**, 1145-1148
- PEGNUM, D G Leukaemic antigens *Brit J Haemat* 1973, **24**, 1-6
- PEGNUM, G D, C A EVANS, AND V I MIDDLETON Stimulation and reactivity of leukaemic cells in acute myeloid leukaemia *Acta Haemat* 1974, **51**, 129-139
- PENNER, P F, I H COHEN, AND I A LOEB RNA-dependant DNA polymerase in human lymphocytes during gene activation by phytohaemagglutinin *Nature New Biol* 1971, **232**, 58-60
- PETER, C S, M R MACKENZIE, AND F J GLASSY T or B cell origin of some non-Hodgkin's lymphoma *Lancet*, 1974, **2**, 686-688
- PINKEL, D Chickenpox and leukaemia *J Pediatrics*, 1961, **58**, 729-737
- PIENERT, W, AND F ZINTL Voordracht op gecombineerde SIOPE/PSHI-Congr, Santa Margharita, october 1974
- PRAGER, D, M BRUDER, AND A SAWITSKY Disseminated vancella in a patient with acute

myelogenous leukemia Treatment with cytosine arabinoside *J Pediatrics*, 1971, **78**, 321-323

PREFYASOMBAT, C, C RICHARDS, M SILVERMAN, AND F M KENNY Cortisol production in Rubella and Varicella encephalopathy with a note on their treatment with steroids *Am J Dis Child* 1965, **110**, 370-373

PRINDLIT, G Maturation of cellular and humoral immunity during human embryonic development *Acta Paed Scand* 1974, **63**, 607-615

RAIF, M C, M STERNBERG, AND R B TAYLOR Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells *Nature* 1970, **225**, 553-554

RAGAB, A H K J LINDQUIST, F J VIETTI, S C CHOI, AND C K OSTERLAND Immunoglobulin pattern in childhood leukemia *Cancer*, 1970, **26**, 890-894

RAINER, H, P HOCKER, F PITTERMANN, AND K MOSER Reverse Transkriptase leukämischer Zellen *Wiener Klin Wschr* 1974, **86**, 117-122

REIS, R B, J H BENNETT, I H HAMILIN, AND H I MAIBACH Aminopterin for psoriasis *Arch Dermatol* (Chicago) 1964, **90**, 544-549

REIS, H, U BRUNTSCH, AND C G SCHMIDT Die Behandlung des Zoster mit Cytarabin *Deutsch Med Wschr* 1973, **98**, 2293-2298

RIGBY, P G, R C ROSENLOF, P T PRATT, AND H M IEMMON Leukemia and Lymphoma *JAMA*, 1966, **197**, 95-100

ROBBINS, K M, I GRIBITZ, I STRAUSS, J C IFONIDAS, AND M SANDERS Pneumonitis in acute lymphatic leukemia during methotrexate therapy *J Pediatrics* 1973, **82**, 84-88

ROITT I *Essential Immunology* 2nd ed Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, 1974, 55-56

ROSENER, F, AND S I IFF Down's syndrome and acute leukemia myeloblastic or lymphoblastic? *Am J Med* 1972, **53**, 203-218

ROSS, A H, F FENCINER, AND G REITMAN Modification of chickenpox in family contacts by administration of gamma globulin *New Engl J Med* 1962, **267**, 369-376

ROSS, G D, F M RABITINO, M J POFFEY, AND H M GREY Combined studies of complement receptor and surface immunoglobulin-bearing cells and sheep erythrocyte rosette forming cells in normal and leukemic human lymphocytes *J Clin Invest* 1973, **52**, 377-385

ROWLEY, M J, I R MACKAY, AND I F C MC KENZIE Antibody production in immunosuppressed recipients of renal allografts *Lancet* 1969, **2**, 708-710

RUDOLPH, R H, I MICKELSON, AND F D THOMAS Mixed leukocyte reactivity and leukemia study of identical siblings *J Clin Invest* 1970, **49**, 2271-2275

SALMON, S F, AND M SIEGMANN B cell neoplasia in man *Lancet*, 1974, **2**, 1230-1233

SANTOS, G W, G M MULLINS, W B BLAS, P N ANDERSON, K D GRAZIANO, D L KILPIN, AND P J BURKI Immunologic studies in acute leukemia *NCI Monogr* 1973, **37**, 69-75

SARAGADHARAN, M G, P S SARIN, AND M V REITZ Reverse transcriptase activity of human acute leukaemic cells purification of the enzyme, response to AMV 70S RNA, and characterization of the DNA product *Nature New Biol* 1972, **240**, 67-72

SCHAISSON, G, C WISSEFBERGER AND J CHAVELET Varicelle et leucémie *Actualités Hematologiques* 1971, **5**, 112-122

SCHROEDER, T M, AND R KIRTH Spontaneous chromosomal breakage and high incidence of leukemia in inherited disease *Blood*, 1971, **37**, 96-112

SCHUMACHER, H R, A I MCCHEFFY, AND T K MALGEI The leukemic and mononucleosis cells III DNA synthesis *Cancer*, 1969, **24**, 692-700

SCHWITZER, M J H *Studies on tumor immunity and lymphocyte kinetics in vitro in acute and chronic lymphatic leukemia* Proefschrift, Amsterdam, 1973

SCHWENK, H U Immunological cell markers on lymphoblasts of patients with acute lymphatic leukemia *Zschr Kinderheilk* 1974, **118**, 87-95

SCOLENICK, F M, S A AARONSON, G J TODARO, EN W P PARKS RNA dependent DNA polymerase activity in mammalian cells *Nature*, 1971, **229**, 318-321

SIEGMANN, B R, F ROSENER Varicella and cytosine arabinoside *Lancet*, 1970, **1**, 307-308

SIEGMANN, M, J I PRELUD'HOMME, AND J C BROUET B and T cell markers in human proliferative blood diseases and primary immunodeficiencies, with special reference to membrane bound immunoglobulins *Transpl Rev* 1973, **16**, 85-113

- SIN, I. AND L. BORELIA. Expression of cell-surface markers on T and B lymphocytes after longterm chemotherapy of acute leukemia. *Cell. Immunol.* 1973, **9**, 84-95.
- SHIVACH, E. M., E. S. JAFFE, AND I. GREEN. Receptors for complement and immunoglobulin on human and animal lymphoid cells. *Transpl. Rev.* 1973, **16**, 3-28.
- SHVIR, R. T., J. P. UTZ, J. FAHEY, AND F. FREI. III. Antibody response in patients with acute leukemia. *J. Lab. Clin. Med.* 1960, **56**, 634-643.
- SIMONE, J. V., F. HOLLAND, AND W. JOHNSON. Fatalities during remission of childhood leukemia. *Blood*, 1972, **39**, 759-770.
- SIMONE, J. Acute lymphocyte leukemia in childhood. *Sem. Hemat.* 1974, **11**, 25-30.
- SKURVOVICH, S. V., I. A. MAKHONOVA, F. M. REZNICHENKO, AND G. I. CHERVONSKIY. Treatment of children with acute leukemia by passive cyclic immunization with autoplasm and autoleukocytes operated during the remission period. *Blood*, 1969, **33**, 186-197.
- SMITH, J. I., C. R. BARKER, G. P. CLIFIN, AND R. D. COLLINS. Characterisation of malignant mediastinal lymphoid neoplasm (Sternberg sarcoma) as thymic in origin. *Lancet*, 1973, **1**, 74-77.
- SMITH, J. I., AND D. HARGRETT. B- and T-lymphocyte markers on transformed lymphocytes from mitogen-stimulated cultures of normal and CLL lymphocytes and on tonsil blasts. *Clin. Exp. Immunol.* 1974, **17**, 547-560.
- SMITHERS, D. W. Hodgkin's disease: one entity or two. *Lancet*, 1970, **2**, 1285-1287.
- SOKAL, J. E., AND D. FIRAT. Varicella-Zoster infection in Hodgkin's disease. *Am. J. Med.* 1965, **39**, 452-463.
- SOLTHAM, C. M. Summary: Immunology of acute leukemia and Burkitt's Tumor. *Cancer Res.* 1967, **27**, 2554-2556.
- SPIERS, A. S. D. Chemotherapy of acute leukaemia. *Clin. Haemat.* 1972, **1**, 127-164.
- STELL, C. M. AND D. A. HARDY. Evidence of altered antigenicity in cultured lymphoid cells from patients with infectious mononucleosis. *Lancet*, 1970, **1**, 1322-1323.
- STEINBERG, A. G. The genetics of acute leukemia in children. *Cancer*, 1960, **13**, 985-999.
- STEVENS, D. A., AND C. MERIGAN. Uncertain role of cytosine arabinoside in varicella infection of compromised hosts. *J. Pediatrics*, 1972, **81**, 562-565.
- STEVENS, D. A., G. W. JORDAN, T. F. WADDELL, AND T. C. MERIGAN. Adverse effect of cytosine arabinoside on disseminated zoster in a controlled trial. *New Engl. J. Med.* 1973, **289**, 873-878.
- STEVENSON, P. A., AND M. G. MOTT. Membrane immunofluorescence in acute lymphoblastic leukemia. *New Engl. J. Med.* 1974, **288**, 1127-1128.
- STEWART, A. M. Epidemiology of acute (and chronic) leukaemias. *Clin. Haemat.* 1972, **1**, 3-22.
- STIRNSWÄRD, J., M. JONDAI, F. VANKY, H. WIGZEL, AND R. SFALY. Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. *Lancet*, 1972, **1**, 1352-1356.
- STOOP, J. W., B. J. H. ZIGERS, C. VAN DER HEIDEN, AND R. E. BALLIEUX. Monoclonal gamma-pathy in a child with leukemia. *Blood*, 1968, **32**, 774-786.
- SULLIVAN, M. Non-Hodgkin's lymphoma of childhood in: *Clinical Pediatric Oncology*. Ed. W. W. Suttow, T. J. Vietti, and D. J. Fernbach. C. V. Mosby Company, Saint Louis, 1973, 313-336.
- SUTHERLAND, R. M., W. RODGERFICHI, AND J. A. MCCREDIE. Phytohaemagglutinin (PHA) induced transformation of lymphocytes from patients with cancer. *Cancer*, 1971, **27**, 574-578.
- SUTTON, R. N. P., N. P. BISHUN, AND J. F. SOUTHILL. Immunological and chromosomal studies in first degree relatives of children with acute lymphoblastic leukaemia. *Brit. J. Haemat.* 1969, **17**, 113-119.
- SUTTON, R. N. P., S. D. MARSTON, H. J. M. PULLEN, C. W. DARBY, D. I. K. EVANS, AND R. T. D. FMOND. Antibodies to Epstein-Barr and other viruses in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Arch. Dis. Child.* 1974, **49**, 540-544.
- SYBESMA, J. PH. H. B., J. D. HOLTZER, AND B. J. M. ZEGERS. Antistofproductie na influenzavaccinatie bij enkele hematologische ziektebeelden. *N. T. v. G.* 1973, **117**, 672-675.
- TEHLET, F., AND O. SCHWEISGUTH. La maladie de Hodgkin chez l'enfant, étude de 72 observations personnelles. *Arch. Franç. de Péd.* 1968, **25**, 313-358.
- TREPII, F. Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klin. Wschr.* 1974, **52**, 511-515.



- DE VAAN, G A M, AND G P VOOYS Acute leukaemia with mediastinal infiltrate simulating pericarditis *Acta Paed Scand* 1970, **59**, 90-93
- DE VAAN, G A M, J A J M BAKKEREN, E D A M SCHRETLEN, AND H REFRINK L'asparaginase treatment of acute leukaemia in children *Acta Paed Scand* 1971, **60**, 22-26
- DE VAAN, G A M, J A J M BAKKEREN AND E D A M SCHRETLEN Studies on PHA stimulation of blood lymphocytes and/or blasts in acute leukaemia before treatment and at relapse, in *Leukamien und maligne Lymphome* Ed A Stacher, Urban en Schwarzenberg, Munchen, 1972, 599-603
- DE VAAN, G A M Neurologische afwijkingen bij acute leukemie etiologie, diagnostiek en behandeling *NT v G* 1974, **118**, 336-339
- DE VAAN, G A M, J A J M BAKKEREN AND E D A M SCHRETLEN T cell qualities of lymphocytes and/or leukemic cells from peripheral blood in A M L and A L L before treatment and at relapse *Biomedicine* 1975, in press
- DIANNA, N J, J N P DAVIES, A K POIAN, AND P WOLFGANG Familial Hodgkin's disease an environmental and genetic disorder *Lancet*, 1974, **2**, 854-857
- VIZA, D C, O BERNARD-DEGANI, C BERNARD, AND R HARRIS Leukaemia antigens *Lancet*, 1969, **2**, 493-494
- VIZA, D, D A I DAVIES, R TODD, O BERNARD-DEGANI, C BERNARD, AND R HARRIS Mise en evidence, isolement et purification partielle d'antigenes leucemiques chez l'homme *Presse Med* 1970, **78**, 2259-2264
- VIZA, D Immunological Aspects of Human Leukaemia *Series Haematol* 1972, **5-5**, 87-108
- VOSSIN, J M, AND W HJLMANS Membrane associated immunoglobulin determinants on bonemarrow and blood lymphocytes in the pediatric age group and on foetal tissues *Annals of the New York Academy of Sciences* 1975, in press
- WAHLEN, W, A PAPPAS, G SCHWARZT, AND O KAUSCH Cell mediated immunity in leukemic children during remission undergoing longterm chemotherapy *Klin Padiat* 1974, **186**, 165-169
- WALKER, J S, D DAVIES, P DAVIES, C B FREEMAN, AND R HARRIS Immunological studies in acute myeloid leukaemia PHA-responsiveness and serum inhibitory factors *Brit J Cancer* 1973, **27**, 203-211
- WALLACH, D F H Generalized membrane defects in cancer *New Engl J Med* 1969, **280**, 761-767
- WEGMANN, W, F LARGIADER, AND U BINSWANGER Maligne Geschwulste nach Nieren-transplantation *Schw Med Wschr* 1974, **104**, 809-814
- WEISGERBER, C, AND G SCHAISON Les leucemies myelomonocytaires du petit enfant *Actual Hematol* 1970, **4**, 47-58
- WEISGERBER, C, G SCHAISON, AND J TANZER Leucémies aiguës des mongoliens *Actual Hematol* 1971, **5**, 143-154
- WERTEIGCKI, W, C G PIATO, J F FRAUMENI, AND J D NISWANDER Dermatoglyphics in Leukemia *Ped Res* 1973, **7**, 620-626
- WILFERT, C M Disseminated varicella in a patient with leukemia *J Pediatrics* 1971, **79**, 172-173
- WILSON, J D, AND A D F HURDLF Surface immunoglobulins on lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia and lymphosarcoma *Brit J Haemat* 1973, **24**, 563-569
- ZIMMER, J, A S KHALIFA, AND J J LIGHTBODY Decreased lymphocyte adenosine deaminase activity in acute lymphocytic leukemic children and their parents *Cancer Res* 1975, **35**, 68-70
- ZORBAIA-MALLIOS, H, AND R N P SUTTON EB-virus-specific IgM antibodies in first degree relatives of children with acute lymphoblastic leukaemia *Lancet* 1974, **1**, 119-120
- ZORBAIA-MALLIOS, H, R N P SUTTON, AND R T D EMOND EB-virus specific IgM and IgG antibodies in first-degree relatives of children with acute lymphoblastic leukaemia *Arch Dis Child* 1975, **50**, 137-141
- ZWILZER, W W, AND D COX Genetic aspects of leukemia *Sem Hemat* 1969, **6**, 228-249

## CURRICULUM VITAE

De auteur van dit proefschrift werd geboren te Eindhoven op 10 oktober 1932. In 1950 legde hij het eindexamen H.B.S.-B af aan het Triniteitslyceum te Haarlem. Daarna studeerde hij geneeskunde aan de Gemeentelijke Universiteit te Amsterdam, waar hij het artsexamen aflegde in 1959. In 1959 was hij gedurende een half jaar assistent-arts in het Emma-Kinder Ziekenhuis te Amsterdam.

Van december 1959 tot juni 1961 was hij dienstplichtig reserve luitenant-arts aanvankelijk bij de Militaire Geestelijke Gezondheidszorg in den Haag, later op de afdeling Psychiatrie van het Militair Hospitaal te Utrecht. De opleiding tot kinderarts vond plaats in het Emma Kinderziekenhuis te Amsterdam (Dr. F. Kuipers, 1961-1963) en in het Wilhelmina Kinderziekenhuis te Utrecht (1963-1965) onder de leiding van wijlen Prof. Dr. H. A. Weyers. Sinds augustus 1965 is hij verbonden aan de Universiteitskinderkliniek te Nijmegen, en daarbij speciaal belast met de behandeling en research van en bij kinderen met oncologische en hematologische aandoeningen.



# STELLINGEN

## I

Kinderen, waarbij een acute leukemie ontstaat, zijn daartoe niet gepredisponeerd door een immunologische deficiëntie.

## II

Een gunstig effect van het cytosine-arabinoside op het verloop van waterpokken of gordelroos bij patienten, die corticosteroiden of cytostatica gebruiken is onwaarschijnlijk.

## III

Het effect van een boostervaccinatie met difterie-tetanus-poliomyelitis vaccin op de cellulaire en humorale immuniteit is individueel geheel verschillend.

## IV

Iatrogene immuunsuppressie is bij de individuele patient niet meetbaar door functioneel onderzoek van bloedlymfocyten.

## V

De A.L.L. is een woekering van „prolymfocyten”, die nog verkeren in het beenmergstadium van hun rijping. Bij het lymfoblastaire lymfosarcoom gaat deze woekering waarschijnlijk uit van uitgerijpte lymfocyten.

## VI

De verschillen in  $^3\text{H}$ -Thymidine opname in vitro tussen de maligne cellen, afkomstig van resp. A.L.L. en A.M.L. patienten zijn zo groot, dat zij een differentiaal diagnosticum vormen.

## VII

Bij een verworven pancytopenie is bij kinderen het effect van androgenen meestal gunstig. Mede omdat een van de oorzaken een „pre-leukemie” kan zijn, dient de beenmergtransplantatie niet de eerste therapiekeuze te zijn.



## VIII

Indien een A.L.L. bij een kind debuteert met een normaal of verhoogd aantal granulocyten en een linksverschuiving, is er eerder sprake van een gedissemineerd lymfosarcoom dan van een A.L.L.

## IX

Bij zuigelingen zal een coeliakie-trait eerder tot een manifeste coeliakie leiden, indien reeds zeer vroeg rijstbloem door tarwebloem wordt vervangen

## X

De diagnose neurofibromatosis van Recklinghausen dient men o.a. te overwegen bij kinderen met een hypertensie en verder ook bij kinderen met een grote schedelomtrek die zwakbegaafd zijn.

## XI

De congenitale agammaglobulinemie kan o.a. berusten op een primaire stoornis van de T-lymfocytfunctie.

N. M. ZALDIVAR C.S., *Ped. Research*, 1975, 5, 541-547

## XII

Kinderoncologische centra dienen in het belang van de patient en zijn gezinsleden geografisch optimaal over het land verspreid te zijn. Een gebalanceerde taakverdeling tussen centrum en de arts ter plaatse is van vitaal belang voor deze patienten.

## XIII

Mondiaal gezien zijn de landen van de E.E.G. provincies, het ontbreken van een Europese regering onderhoudt de fictie dat zij de facto soevereine staten zouden zijn.

## XIV

Het onderwijs in de geschiedenis schaffe men af; nog nooit werden de lessen geleerd.

G. A. M. de Vaan. Nijmegen, 25 september 1975



